



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

“Elaboración de nanopartículas de metales de transición soportados en una matriz de propóleo y quitosano mediante electrospinning, como posible antifúngico.”

Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniero Químico

AUTORES:

Marco Francisco Alvarado López – CI: 0105355135

francisco_4alvarado@hotmail.com

Jhonny David Ponce Montalvo – CI: 1315297604

jhonnydavidpm@gmail.com

DIRECTOR:

PhD. Christian Américo Cruzat Contreras – CI: 0107985681

CUENCA – ECUADOR

20 de junio del 2020



RESUMEN

Las enfermedades en los cultivos son producidas por factores bióticos que alteran las funciones fisiológicas de las plantas y en casos extremos provocan la muerte de las plantaciones, entre estos factores se encuentran los hongos. Las estrategias usadas por los agricultores para evitar pérdidas en sus cultivos debidas a infestaciones de patógenos fungales incluyen la aplicación de pesticidas de síntesis química. Sin embargo, las poblaciones de hongos, objeto de control, pueden generar resistencia, originando graves problemas a los productores. El objetivo de este estudio es desarrollar un nuevo fungicida a partir de la obtención de una matriz polimérica dopada con nanopartículas de metales de transición (hierro y zinc) soportadas en una matriz polimérica de quitosano y propóleo refinado. Para ello, se obtuvieron las nanopartículas mediante la técnica solvotermal, a causa de su simplicidad y por involucrar una cinética de reacción acelerada. El propóleo fue utilizado puesto que presenta propiedades antimicrobianas y antifúngicas, esto asociado a la gran cantidad de flavonoides, polifenoles, esteroides, aldehídos, aminoácidos y quinonas, a quienes se les confieren, estas capacidades.

Se realizaron las síntesis de nanopartículas variando parámetros de reacción (temperatura, tiempo y precursor de Zinc). Para el caso de las matrices poliméricas se obtuvieron films de cuatro tipos, quitosano, quitosano/extracto de propóleo, quitosano/nanopartículas y quitosano/extracto de propóleo/nanopartículas. La calorimetría diferencial de barrido determinó un aumento de la estabilidad térmica en las matrices que poseían propóleo y un menor contenido de agua. La microscopía electrónica de transmisión, la difracción de electrones de área seleccionada y la difracción de rayos X, demostraron la estructura de las nanopartículas, siendo estas en mayor cantidad propias de la espinela de hierro (Fe_3O_4). La microscopía electrónica de barrido determinó una estructura tipo nanofilm de las matrices poliméricas electrohiladas. Los ensayos de liberación se ajustaron a modelos matemáticos siendo el modelo que mejor se ajusta el de Korsmeyer y Peppas, en donde el propóleo fue la única sustancia que se liberó en el medio (etanol al 70%). Por último, se determinó la actividad antifúngica de las nanopartículas, matrices poliméricas y soluciones utilizadas en *electrospinning* por medio de un ensayo in vitro frente al hongo *Fusarium sp.*

Palabras claves: Nanopartículas, propóleo, quitosano, síntesis solvotermal, electrospinning, ensayos de liberación, fungicida.



ABSTRACT

Diseases in crops are caused by biotic factors that alter the physiological functions of plants and in extreme cases causing the death of plantations, among these factors are fungi. The strategies used by farmers to avoid losses in their crops due to fungal pathogen infestations include the application of chemical synthesis pesticides. However, controlled fungal populations can generate resistance, causing serious problems for growers. The objective of this study is to develop a new fungicide from obtaining a polymer matrix doped with transition metal nanoparticles (iron and zinc) supported on a polymeric matrix of chitosan and refined propolis. For this, we obtained the nanoparticles using the solvothermal technique, a reason for their simplicity and for involving accelerated reaction kinetics. Propolis was used since it has antimicrobial and antifungal properties, this associated with the large amount of flavonoids, polyphenols, steroids, aldehydes, symptoms and quinones, to whom these capacities are conferred.

Nanoparticle syntheses were performed by varying reaction parameters (temperature, time and Zinc precursor). In the case of polymeric matrices, films of four types were obtained: chitosan, chitosan / propolis extract, chitosan / nanoparticles and chitosan / propolis extract / nanoparticles. Differential scanning calorimetry determined an increase in thermal stability in the matrices that had propolis and a lower water content. Transmission electron microscopy, electron diffraction of selected area and X-ray diffraction, demonstrated the structure of the nanoparticles, being these in greater quantity than the iron spinel (Fe_3O_4). Scanning electron microscopy determined a nanofilm-like structure of the electrospun polymer matrices. The release tests were adjusted to mathematical models, the Korsmeyer and Peppas model being the best fit, where propolis was the only substance that was released into the medium (70% ethanol). Finally, the antifungal activity of the nanoparticles, polymer matrices and solutions used in electrospinning was determined by means of an in vitro test against the fungus *Fusarium* sp.

Keywords: Nanoparticles, propolis, chitosan, solvothermal synthesis, electrospinning, release assays, fungicide



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE ECUACIONES	8
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	9
AGRADECIMIENTOS	16
DEDICATORIA	18
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
CAPÍTULO 2: CONTENIDO TEÓRICO	23
Nanotecnología	23
Bionanocompuestos.....	23
Nanopartículas	24
Matrices poliméricas Electrohiladas	24
Espinelas	25
Nanopartículas de espinelas de Hierro - Zinc y síntesis solvotermal.....	26
Quitosano	26
Propóleo	27
Compuestos activos en matrices de quitosano y liberación.....	28
Ensayos de liberación	29
Modelos matemáticos	30
Modelo de Higuchi	30
Modelo de Korsmeyer-Peppas	30
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	31



Universidad de Cuenca

Materiales.....	31
Métodos	31
Extracción del propóleo	31
Síntesis solvotermal	31
Electrospinning	32
Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	32
Ensayos de estabilidad	33
Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	33
Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (IRTF).....	33
Difracción de rayos X	34
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	34
Difracción de electrones de área seleccionada (SAED).....	34
Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	34
Ensayos <i>in-vitro</i>	34
CAPÍTULO 4: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
Síntesis de Nps de Zn-Fe	36
Extracción de los compuestos fenólicos a partir de propóleo.....	36
Electrospinning	36
Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	37
<i>Nanopartículas de Zn-Fe</i>	37
<i>Extracto de Propóleo</i>	39
Análisis DSC.....	41
<i>Matrices poliméricas de CS, CS/EP, CS/Nps, CS/EP/Nps</i>	41
Identificación de grupos funcionales por espectroscopía de Infrarrojo (IRTF).....	43
Ensayo de sedimentación.....	49
Ensayo de estabilidad	51
Análisis DRX	52



Universidad de Cuenca

Análisis MEB	54
Análisis MET	55
<i>Microscopía de campo oscuro</i>	58
<i>Análisis SAED</i>	58
Ensayos de liberación	59
<i>Curva de calibración del propóleo (etanol)</i>	59
<i>Curva de calibración nanopartículas (etanol)</i>	60
<i>Liberación del Propóleo (T= 40 °C)</i>	60
Liberación nanopartículas (T= 40 °C)	62
Liberación del Propóleo y nanopartículas (T= 40 °C)	62
Liberación del Propóleo (T= 30 °C)	64
Liberación nanopartículas (T= 30 °C)	65
Liberación del Propóleo y nanopartículas (T= 30 °C)	66
Ensayos <i>in-vitro</i>	67
□ <i>Matrices poliméricas</i>	67
□ <i>Soluciones:</i>	68
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS	85



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición química del propóleo.....	28
Tabla 2 Mecanismo de transporte por Korsmeyer-Peppas.....	30
Tabla 3 Síntesis de nanopartículas y sus parámetros	36
Tabla 4 Refinamiento del propóleo	36
Tabla 5 Evaluación de parámetros para electrospinning.....	37
Tabla 6 Datos de absorbancia de los ensayos de sedimentación en agua destilada	49
Tabla 7 Datos de concentración del ensayo de sedimentación.....	49
Tabla 8 Identificación de los planos del difractograma de rayos X.....	53
Tabla 9 Datos de los diámetros de partículas obtenidos por el software Image J	57
Tabla 10 Datos ensayos de liberación a 40 °C para la matriz polimérica CS/EEP	60
Tabla 11 Parámetros de los modelos matemáticos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas para los ensayos de liberación a 40 °C de la matriz polimérica CS/EEP	61
Tabla 12 Parámetros de los ensayos de liberación a 40°C para la matriz polimérica de CS/Nps	62
Tabla 13 Datos de los ensayos de liberación a 40°C de la matriz polimérica de CS/EEP/Nps	62
Tabla 14 Parámetros de los modelos matemáticos de Higuchi y Kosmeyer-Peppas para los ensayos de liberación a 40 °C de la matriz polimérica CS/EEP/Nps.....	63
Tabla 15 Datos de los ensayos de liberación a 30 °C de la matriz polimérica CS/EEP .	64
Tabla 16 Parámetros de los modelos matemáticos de Higuchi y Kosmeyer-Peppas para los ensayos de liberación a 30 °C de la matriz polimérica CS/EEP	65
Tabla 17 Datos ensayo de liberación a 30 °C de la matriz polimérica CS/Nps	65
Tabla 18 Datos de los ensayos de liberación a 30 °C de la matriz polimérica de CS/EEP/Nps	66
Tabla 19 Parámetros de los modelos matemáticos de Higuchi y Kosmeyer-Peppas para los ensayos de liberación a 30 °C de la matriz polimérica CS/EEP/Nps.....	67



ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Modelo de Higuchi	30
Ecuación 2 Modelo de Korsmeyer-Peppas	30
Ecuación 3 Ley de Bragg	53
Ecuación 4 Fórmula de distancia interplanar para un cristal cúbico	53
Ecuación 5 Ecuación desarrollada de la ley de Bragg	59



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Molécula del quitosano	27
Ilustración 2 Moléculas de pinocembrina y galangina.....	28
Ilustración 3 Espectro UV-Vis de la síntesis JMS1 en agua	38
Ilustración 4 Espectro UV-Vis síntesis JMS3 en agua	38
Ilustración 5 Espectro UV -Vis síntesis JMS5 en agua	39
Ilustración 6 Espectro UV-Vis Síntesis JMS7 en agua.....	39
Ilustración 7 Espectro UV-Vis síntesis JMS8 en agua	40
Ilustración 8 Espectro UV – Vis del extracto de propóleo en etanol al 70%	40
Ilustración 9 DSC de la matrices poliméricas de CS, CS/EEP, CS/Nps, CS/EEP/Nps..	42
Ilustración 10 DSC para el EEP utilizado para la síntesis de las matrices poliméricas ..	43
Ilustración 11 Espectro IR de las matrices poliméricas analizadas: CS en rojo, CS/EEP en morado, CS/Nps en verde y CS/EEP/Nps en celeste	44
Ilustración 12 Espectro IR del EEP.	44
Ilustración 13 Espectro IR de la matriz polimérica de CS	45
Ilustración 14 Espectro IR de la matriz polimérica de CS/EEP	45
Ilustración 15 Espectro IR de la matriz polimérica CS/Nps	45
Ilustración 16 Espectro IR de la matriz polimérica CS/EEP/Nps	46
Ilustración 17. Propuesta de la retención del enlace carbonilo	47
Ilustración 18 Espectro IR de la muestra de nanopartículas JMS1.....	47
Ilustración 19 Espectro IR de la muestra de nanopartículas JMS3.....	47
Ilustración 20 Espectro IR de la muestra de nanopartículas JMS8.....	47
Ilustración 21 Espectro IR del sobrenadante de la síntesis JMS1	48
Ilustración 22 Espectro IR del sobrenadante de la síntesis JMS3	48
Ilustración 23 Espectro IR del sobrenadante de la síntesis JMS8	48
Ilustración 24 Curva de sedimentación Nps JMS1	49
Ilustración 25 Curva de sedimentación Nps JMS3	50
Ilustración 26 Curva de sedimentación Nps JMS5	50
Ilustración 27 Curva de sedimentación Nps JMS7	50
Ilustración 28 Curva de sedimentación Nps JMS8.....	51
Ilustración 29 Ensayo de estabilidad, matrices poliméricas en agua ácida	52



Ilustración 30	Análisis DRX de la muestra JMS1	53
Ilustración 31	Análisis MEB de la fibra de CS	54
Ilustración 32	Análisis MEB de la fibra de CS/Nps	54
Ilustración 33	Análisis MEB de la fibra de CS/EEP.....	55
Ilustración 34	Análisis MEB de la fibra CS/EEP/Nps	55
Ilustración 35	MET de Nps de la muestra JMS3	56
Ilustración 36	MET de Nps de la muestra JMS1	56
Ilustración 37	Distribución normal del tamaño de partícula entre 16 y 34 nm.	57
Ilustración 38	Distribución normal del tamaño de partícula entre 34 y 66 nm	58
Ilustración 39	Campo oscuro de Nps muestra JMS1	58
Ilustración 40	Patrón de difracción SAED	59
Ilustración 41	Curva de calibración del propóleo	59
Ilustración 42	Curva de calibración para las nanopartículas	60
Ilustración 43	Liberación del Propóleo 40 °C (Korsmeyer-Peppas) para la matriz polimérica CS/EEP	61
Ilustración 44	Liberación del propóleo a 40°C (Higuchi).....	61
Ilustración 45	Liberación del Propóleo a 40 °C (Korsmeyer-Peppas) de la matriz polimérica CS/EEP/Nps.....	63
Ilustración 46	Liberación de propóleo a 40°C (Higuchi) para la matriz polimérica CS/EEP/Nps.....	63
Ilustración 47	Liberación del Propóleo a 30 °C (Korsmeyer-Peppas) para la matriz polimérica CS/EEP	64
Ilustración 48	Liberación del propóleo a 30°C (Higuchi) para la matriz polimérica CS/EEP.....	65
Ilustración 49	Liberación del Propóleo a 30 °C (Korsmeyer-Peppas)	66
Ilustración 50	Liberación del propóleo a 30°C (Higuchi) para la matriz polimérica CS/EEP/Nps.....	67
Ilustración 51	Ensayo in vitro con matrices poliméricas, a 7 días de la siembra	67
Ilustración 52	Ensayo in vitro con matrices poliméricas, a 21 días de la siembra	68
Ilustración 53	Crecimiento de Fusarium sp. en cm.....	68
Ilustración 54.	Etanol, quitosano y ácido acético utilizado en el trabajo de titulación...	85
Ilustración 55	Medición de la masa de los reactivos utilizados	85
Ilustración 56	Lavado de nanopartículas.....	85
Ilustración 57	Secado y almacenamiento de nanopartículas	85



Ilustración 58 Maceración del propóleo en etanol.....	86
Ilustración 59 Precipitación de las ceras del propóleo.....	86
Ilustración 60 Preparación de las soluciones poliméricas.....	86
Ilustración 61 Electrohilado de las fibras.....	86
Ilustración 62 Ensayos de liberación	87
Ilustración 63 Almacenamiento de la fibra en una funda ziploc	87
Ilustración 64. DSC para las matrices poliméricas CS (rojo) y CS/EEP (negro).....	87
Ilustración 65. DSC de la matriz polimérica CS/Nps	87
Ilustración 66. DSC de la matriz polimérica CS/EEP/Nps	88
Ilustración 67 Ensayo de estabilidad de las fibras elaboradas.....	88
Ilustración 68 Ensayo de sedimentación de las nanopartículas.....	88
Ilustración 69. Barrido espectral de la muestra JMS3 en etanol	88
Ilustración 70 Espectro UV-Vis del propóleo	89
Ilustración 71 Curvas de calibración de muestras de nanopartículas JMS1 y JMS3.....	89
Ilustración 72 Curvas de calibración de las muestras de nanopartículas JMS5 y JMS7.....	90
Ilustración 73 Curva de calibración de la muestra de nanopartículas JMS8.....	90
Ilustración 74 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS1	90
Ilustración 75 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS3	91
Ilustración 76 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS5	91
Ilustración 77 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS7	91
Ilustración 78 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS8	92
Ilustración 79 Ensayo in vitro con fibras, a 14 días de la siembra	92
Ilustración 80 Ensayos in vitro en naranjas.....	92



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Marco Francisco Alvarado López en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Elaboración de nanopartículas de metales de transición soportados en una matriz de propóleo y quitosano mediante electrospinning, como posible antifúngico", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de junio de 2020

Marco Francisco Alvarado López

C.I: 0105355135



Cláusula de Propiedad Intelectual

Marco Francisco Alvarado López, autor del trabajo de titulación "Elaboración de nanopartículas de metales de transición soportados en una matriz de propóleo y quitosano mediante electrospinning, como posible antifúngico", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor

Cuenca, 20 de junio del 2020

A handwritten signature in blue ink, enclosed in an oval shape.

Marco Francisco Alvarado López

C.I: 0105355135



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Jhonny David Ponce Montalvo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Elaboración de nanopartículas de metales de transición soportados en una matriz de propóleo y quitosano mediante electrospinning, como posible antifúngico", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de junio de 2020

Jhonny David Ponce Montalvo

C.I: 1315297604



Cláusula de Propiedad Intelectual

Jhonny David Ponce Montalvo, autor del trabajo de titulación "Elaboración de nanopartículas de metales de transición soportados en una matriz de propóleo y quitosano mediante electrospinning, como posible antifúngico", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor

Cuenca, 20 de junio del 2020

A handwritten signature in blue ink, reading "Jhonny Ponce", written over a horizontal line.

Jhonny David Ponce Montalvo

C.I: 1315297604



AGRADECIMIENTOS

Marco Alvarado

Se puede llegar hasta el infinito si se tienen la compañía adecuada. Gracias a Dios tengo la dicha de contar con tales personas en mi vida, que día tras día están presentes en este largo camino para hacer de este el mejor de todos.

Sin lugar a dudas las primeras personas a las que agradezco son mis amados padres, José y Isabel, sus enseñanzas y forma de ser llegaron a crear a la persona que soy hoy en día. Ellos han sido mi escudo y mi espada en todos los problemas que se me han presentado, sin su apoyo incondicional quizás nada de esto fuera posible. Mil gracias por todo lo que han hecho por mí. Mi hermana Anita, no creo que exista mejor persona en el mundo para llamarle hermana, te agradezco por todos los momentos compartidos, y por todo lo que me has brindado. Sin tu guía como estudiante no hubiera sido posible llegar aquí, gracias por todas esas clases personalizadas que me diste. Este trabajo es un reflejo de lo que tú me has enseñado, muchas gracias por todo. Mi hermano Daniel, más que un gran amigo, simplemente él ha sido quien me formó como deportista, gracias por transmitirme todo ese amor hacia el deporte, mi mejor compañero de entrenamiento. Te agradezco por cada momento vivido, este trabajo representa todos esos diálogos, donde de niños pensábamos en ser científicos, gracias por siempre estar presente. Mis hermanos Patricio, Nancy y Pablo, no hay palabras para describir lo grandiosos que son. En mis mejores recuerdos están presentes ustedes, sus consejos siempre han sido una guía. Patricio gracias por ser ese hermano mayor que siempre está buscando la forma de ayudar y enseñar, tu carisma te hace muy especial. Nancy gracias por tu buena y dulce manera de ser, siempre pendiente de toda tu familia. Pablo tu sencillez y amistad fue y será algo que siempre recordaré de ti, espero pronto volverte a ver. Gracias hermanos por toda la ayuda brindada en este largo camino.

Por último, agradezco al Dr. Cristian Cruzat por ser parte de este proceso como estudiante, desde su primera clase no dude en su capacidad como persona y profesional. Muchas gracias por haberme compartido sus conocimientos y por haberme permitido ser parte de su proyecto de investigación, este trabajo es un reflejo de todo lo que nos ha podido enseñar.

Y sin duda alguna, agradezco a Dios por el hecho de existir, guiarme, cuidarme y brindarme la vida misma.



Jhonny Ponce

Siempre he pensado que la mayor virtud del ser humano es la gratitud. Para mí la gratitud es una forma de reconocer lo pequeños que somos en este mundo y que nuestros logros son el fruto del aporte de muchas personas.

Quiero agradecer a Dios por demostrarme su amor cada día, por haberme puesto a muchas personas maravillosas en mi camino y por ayudarme a estar en paz. A mis padres por que, durante esta etapa, han hecho un esfuerzo enorme por apoyarme en mis estudios sin dejar de brindarme su amor incondicional y palabras de aliento. A mis abuelitas que en cada viaje a Manta me recibían con un abrazo afectuoso y una comida caliente: ellas son el motivo por el cual soporto esas 8 horas en bus. A mis abuelos que me aconsejaban mucho y, con su ejemplo, forjaron mi carácter. A mi hermano que, a pesar de no llevarnos bien, me acompañó en esta travesía y me ayudaba a mantener en orden el departamento.

Al doctor Cruzat y la doctora Vanegas por haberme dado la oportunidad de realizar el trabajo de titulación en el Centro de Estudios Ambientales y compartir su vasto conocimiento y experiencia. A los ingenieros Pablo, Daniel y Diana que me hicieron sentir un ingeniero más y que me apoyaron y asesoraron en el trabajo de laboratorio. A Sandrita que siempre me recibió con una sonrisa en el rostro y que me ayudaba cuando lo necesité.

A mi novia, Daniela, que nunca dejó que me rindiera y que estuvo siempre a mi lado cuando más la necesitaba. A mis compañeros, en especial a Fausto, que me enseñó una de las lecciones más importantes de mi vida: Con esfuerzo y dedicación se puede llegar lejos. Y a Ángel David, que ha sido mi inspiración, mi fortaleza y la razón por la que cada día quiero ser una mejor persona.



DEDICATORIA

Marco Alvarado

Cuando ya no puedes más, siempre estará una madre y un padre para ayudarte. Este trabajo se lo dedico a mis padres, ellos son los verdaderos merecedores de este logro. Su valentía, esfuerzo y sacrificio permitieron que llegue a lograr este objetivo.

A toda mi familia y seres queridos dedico de forma especial este trabajo de titulación como Ingeniero Químico porque de una u otra forma siempre creyeron y confiaron en mí.

Jhonny Ponce

A lo largo estos años, hubo muchas personas que han confiado en mí a las cuales les adjudico esta meta. A mis padres, que son los seres que más admiro en el mundo y a los que les debo todo.

A mi familia que me supieron apoyar y animar en todo momento. A mis amigos y mi novia que siempre creyeron en mí y que me enseñaron a ser mejor persona.



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El mundo en el siglo XXI se enfrenta a muchos desafíos, uno de los más importantes es que la agricultura moderna tiene la responsabilidad de brindar los alimentos necesarios a la humanidad. La demanda de alimentos va en aumento a causa al incremento de la población mundial, esto involucra un mejor desarrollo en los sistemas de agricultura y elaboración de productos alimenticios para poder proveer y mantener los niveles óptimos en la población (FAO, 2009). Dentro de los principales problemas que afronta la agricultura moderna están los diferentes tipos de patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos y malezas, que perjudican los cultivos, desde la semilla, a la planta y los frutos, los cuales se han podido disminuir con la aplicación de plaguicidas generalmente de síntesis química (Pérez et al., 2013).

Ecuador, debido a su ubicación geográfica, clima y otros factores, tiene un gran potencial rural que favorece la agricultura, por lo tanto, necesita llevar un control más profundo de las enfermedades que pueden atacar a todos sus cultivos (Alvarado & Arcentales, Valdez, 2019).

El desarrollo tecnológico permitió que la elaboración de plaguicidas sintéticos aumente notablemente en los últimos años. Actualmente, la producción agrícola utiliza una gran cantidad de plaguicidas químicos, los cuales tienen impacto negativo en el ambiente ya que contaminan el suelo y los cuerpos de agua y atacan a organismos no-objetivo. Además, muchos de estos plaguicidas han perdido su actividad antifúngica puesto a que los hongos empiezan a generar resistencia (García- Gutiérrez & Rodríguez-Mesa, 2012).

En virtud de esto, existe una creciente necesidad de reemplazar los agentes químicos convencionales por sustancias menos tóxicas, lo cual exige el diseño de nuevos fungicidas de amplio espectro. Hoy en día, en varios países, las medidas gubernamentales se han tornado más estrictas con la vigilancia de estos plaguicidas químicos para mejorar la eficiencia de los mismos en la agricultura (Muiño et al., 2007). Esta disposición, promueve el desarrollo de un campo de investigación en el cual se trabaje con nuevos compuestos que permitan disminuir la afección por plagas en los cultivos, y que no tengan un fuerte impacto ambiental como los plaguicidas tradicionales (Silva Castro et al., 2018).

Las nuevas investigaciones buscan generar nuevos agentes antifúngicos que sean amigables con el planeta, entre los cuales tenemos: la síntesis de un complejo formado por quitosano (CS) y nanopartículas (Nps) de cobre (Viñanzaca, 2019) (Sun et al., 2012),



la formación de un copolímero de injerto de quitosano con ácido poliláctico (PLA) cargadas con Nps de flusilazol (Mei et al., 2014), la estructuración recubrimientos modificados con aceites esenciales, (Regnier et al., 2009), la preparación de una solución de nanopartículas de plata con el extracto de la semilla de olivo (Khadri et al., 2013), encapsulación del extracto de plantas en una matriz polimérica de CS (Lira et al., 2006), entre otros. De los antes mencionados, un compuesto que también ha demostrado ser un gran candidato a ser un antifúngico es el propóleo, ya que este presenta una buena actividad antimicrobiana contra muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y hongos (Peng et al., 2012).

Según las investigaciones antes mencionadas, se puede observar que el quitosano es actualmente uno de los polímeros naturales con mayor potencial para su uso en nanotecnología por su carácter catiónico, sus propiedades gelificantes y filmogénicas (lo cual lo hace ideal para la liberación controlada de sustancias) (Expósito Harris, 2010). Además, es muy efectivo para su aplicación en el sector agrícola debido su propiedad fungicida y que se puede combinar con compuestos funcionales, naturales o nanopartículas metálicas que permitan eliminar los diferentes problemas asociados con el uso de compuestos químicos de alta toxicidad. De igual manera, se caracteriza por ser biocompatible, biodegradable y presentar propiedades antimicrobianas. De hecho, se espera que todos los hongos sean vulnerables al quitosano, excepto aquellos que contienen quitosano como compuesto de pared celular que se encuentra rodeando a la membrana plasmática (Silva Castro et al., 2018).

Según reporta Cortés-Higareda y colaboradores (Cortés Higareda et al., 2019), el CS al ser combinado con el propóleo presenta acción sinérgica, ya que mostró una considerable disminución del hongo *Aspergillus flavus*. Asimismo, el propio autor destacó que la actividad contra los microorganismos está relacionada con el efecto sinérgico de los flavonoides más que la acción de cada uno por separado, como la galangina, que es un flavonol con acción bacteriostática, y la pinocembrina, que es una flavonona con acción antimicrobiana y antimicótica (Stangaciu, 1998). Estos compuestos fenólicos tienen la capacidad de desordenar el citoplasma, la membrana y la pared celular de los microorganismos e inhibir su síntesis de proteínas, además, podría estar actuando sobre la inhibición de la replicación del ADN, todo esto se puede atribuir a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (Martínez Flórez et al., 2002).



Universidad de Cuenca

En lo que respecta a las nanopartículas tipo espinela, se han desarrollado investigaciones con nanoferritas de cobre y níquel (CoFe_2O_4 y NiFe_2O_4) en donde se ha demostrado la actividad antifúngica de estos compuestos frente a *Colletotrichum Gloeosporioides*, *Dematophora Necatrix* y *Fusarium Oxysoprum*. La actividad antifúngica del mismo se le atribuye a la alta reactividad que presentan, lo que afecta a los microorganismos incluso en concentraciones muy bajas (Sharma et al., 2017).

En otros estudios realizados, (Davarpanah et al., 2019) demostraron los efectos antifúngicos de las nanopartículas de ferrita $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ y CoFe_2O_4 dentro del rango de 4-64 $\mu\text{g/ml}$ contra los hongos *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum*. También postula que las Nps de óxidos metálicos presentan mecanismos de acción inhibitoria como la liberación de iones metálicos, la generación de especies reactivas de oxígeno, la destrucción de la membrana externa y la internalización de partículas en microorganismos (Stankic et al., 2016).

Por lo tanto, el propóleo, el quitosano y las nanopartículas tipo espinela de óxidos metálicos serían potenciales elementos para la elaboración de un nuevo agente fungicida orgánico que permita el control de plagas en cultivos.



OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

Objetivo General

- Elaborar matrices poliméricas a partir de quitosano, propóleo y nanopartículas de metales de transición, mediante la técnica de *electrospinning*.

Objetivos Específicos

- Determinar la influencia de los precursores (Zn , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$), tiempo de reacción (8 y 24 horas) y temperatura de reacción (200°C y 160°C) utilizados en la síntesis.
- Determinar los parámetros de trabajo en la técnica del *electrospinning* (voltaje, flujo y altura).
- Evaluar la eficiencia de liberación del propóleo a diferentes temperaturas. (30°C y 40°C).
- Realizar los primeros ensayos in-vitro tendiendo a proyectar la matriz (quitosano, propóleos, nanopartículas) como un posible antifúngico.



CAPÍTULO 2: CONTENIDO TEÓRICO

Nanotecnología

El término “nanotecnología” como tal es muy usado actualmente y su definición varía de un campo a otro dependiendo de su punto de análisis (Poole & Owens, 2003). De manera general, se define como la comprensión, el control y reestructuración de la materia en el orden de nanómetros para la creación de materiales con propiedades nuevas. De esta forma, la nanotecnología abarca dos enfoques principales: el enfoque “top down” que hace referencia a la disminución de las estructuras a nanoescala mientras mantienen sus propiedades originales sin control a nivel atómico. El otro enfoque es el llamado “bottom up” dentro del cual los materiales se modifican a partir de componentes moleculares mediante un proceso de ensamblaje (Sanchez & Sobolev, 2010).

Esta rama de la ciencia ha ganado importancia en los últimos años puesto que los materiales se comportan de una manera diferente dependiendo de su tamaño. Así, a nanoescala se modifican las interacciones de las fuerzas de las moléculas lo cual modifica los impactos que estos tienen en el medioambiente, la salud humana o el ecosistema (Martins, 2013)

Bionanocompuestos

En la actualidad, uno de los grandes campos de estudio son los biocompuestos nanométricos, que son materiales por lo general producidos a partir de recursos biodegradables (polisacáridos, proteínas, lípidos y polímeros sintéticos biodegradables). (Maftoonazad & Ramaswamy, 2018).

Este grupo de materiales del tamaño entre 1-100 nm se forman por la mezcla de polímeros naturales y sólidos inorgánicos. Estos muestran propiedades estructurales y funcionales mejoradas, las que resultan atractivas para diferentes aplicaciones (Darder et al., 2007).

Últimamente, el desarrollo de materiales biocompatibles ha sido impulsado por la creciente tendencia al uso de componentes renovables que tengan una baja huella de carbono y que sean biodegradables (Reddy et al., 2013). Muchos plásticos de base ecológica han presentado problemas porque tienen un intervalo de procesamiento estrecho, hidrofílico y una conductividad deficiente. Sin embargo, los bionanocompuestos resultan ser una opción prometedora de componentes con buenas propiedades ópticas, electrónicas o magnéticas al tiempo que conservan la fácil procesabilidad de los polímeros



(Mezzenga & Ruokolainen, 2009).

Nanopartículas

Este tipo de materiales ha existido desde hace siglos en el planeta, se puede poner como ejemplo las nanopartículas que contiene el humo y las que están presentes en el interior de algunas bacterias (Gutiérrez Wing, 2006). Son estructuras de tamaño nanométrico que poseen un área específica elevada y por lo menos una de sus dimensiones entre 1 y 100nm, en consecuencia, hay más superficie expuesta para la colisión molecular por lo que pueden incrementar la velocidad de los mecanismos de reacción (Mohanraj & Chen, 2007). Con las síntesis de estos materiales es indispensable conocer sus propiedades y aplicaciones reales, para que así puedan llegar a contribuir en el desarrollo y calidad de vida de la sociedad. Si se realiza una comparación con un material de escalas mayores, los materiales nanométricos poseen propiedades asombrosas, o incluso pueden aparecer propiedades nuevas y desconocidas. Es por esto que es necesario su investigación respectiva, lo que ayuda a una mejor comprensión y por lo tanto podremos tener mejores aplicaciones tecnológicas (Morán Lopez & Rodríguez López, 2013).

Nanofibras electrohiladas

Con el nacimiento de la nanotecnología cada vez hay más interés por estudiar las propiedades de los materiales que se encuentran en el rango de los nanómetros. Si se buscan estructuras que sean de excelente aplicabilidad en varios campos, las estructuras porosas y mecánicamente estables podrían ser las ideales. Las nanofibras son estructuras poliméricas con diámetros que van desde los 2 nm hasta varios micrómetros (Bhardwaj & Kundu, 2010). Partiendo de las nanofibras se pueden obtener materiales fuertes, livianos, porosos y con una elevada superficie específica, cuyas características podrían modularse fácilmente (García, 2013).

Un punto fuerte es que las nanofibras electrohiladas se estudian con creces y sus posibles aplicaciones se demuestran en gran medida (Persano et al., 2013)

La técnica de *electrospinning* ha surgido rápidamente puesto que es un método simple y confiable para la elaboración de nanofibras, pudiendo tener una morfología ajustable a partir de la modificación de parámetros y una variedad de polímeros. Este proceso implica la generación de un elevado voltaje para crear un arco eléctrico que permita generar las nanofibras a partir de la solución del polímero cargado (Ahmed et al., 2015).



Universidad de Cuenca

Debido a las investigaciones que se han realizado, las fibras que se realizan por *electrospinning* tienen una prometedora aplicación en la ingeniería de tejidos porque su estructura se asemeja a la de una matriz extracelular (Pham et al., 2006), además en vendajes para heridas, biosensores, y filtración. Entre las principales ventajas que ofrecen este tipo de fibra, está su capacidad de manipular los componentes presentes para que se pueda disponer de las propiedades y funciones deseadas, también dispone de una elevada relación superficie/volumen, y porosidad variable (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Espinelas

La estructura tipo espinela, lleva su nombre por el mineral espinela, $MgAl_2O_4$ (Jaramillo Nieves, 2012), Son óxidos metálicos con estructura cristalina cúbica centrada en las caras (Montoya Carvajal et al., 2015).

Estos compuestos tienen una gran versatilidad ya que poseen múltiples usos y mejores propiedades físicas y químicas (León, 2017).

Químicamente las espinelas tienen por fórmula AB_2X_4 . Los elementos A (catión divalente), B (catión trivalente) y X (anfígenos) pueden ser: A= Zn, Cd, Fe, Cu, Ge; B=Cr, Al, Co, Ga, In y X= O, Se, Te, S, respectivamente. Están dispuestos de una forma compacta de iones X que forman una red cúbica y producen intersticios que son ocupados por los cationes A o B. Cuando la espinela presenta una estructura cúbica de caras centradas se la denomina espinela normal, los elementos A (8 en total) se encuentran en los sitios tetraédricos mientras que los sitios octaédricos se encuentran ocupados por los elementos B (16 en total); si esto se invierte se tiene una espinela de tipo inversa, debido a que los cationes intercambian sus posiciones (Vargas Hernández et al., 2009). Esta disposición pertenece a una red de Bravais, tipo FCC, de 14 iones (dos de A^{2+} , cuatro de B^{3+} y 8 de O^{2-}) (Camargo Zambrano, 2011).

Una espinela normal tiene como celda unitaria, 56 átomos, donde 8 pertenecen al elemento A, 16 al elemento B y 32 al elemento X (por lo general oxígeno) (Camargo Zambrano, 2011).



Nanopartículas de espinelas de Hierro - Zinc y síntesis solvotermal

La espinela de hierro (Fe_3O_4) es un óxido abundante en la naturaleza, ha sido muy estudiada en virtud de sus fantásticas propiedades eléctricas y de biocompatibilidad. Sin embargo, estas nanopartículas exhiben propiedades magnéticas bajas lo que podría llegar a limitar su uso en ciertas investigaciones, como en el caso de la electrónica (Liu et al., 2016). Es por esta razón, que se sustituye los cationes divalentes con otros elementos metálicos para mejorar o modificar su magnetización. Este óxido por lo general presenta cationes que reemplazan al Fe en su estructura (por ejemplo, Zn, Ni, Mn, Al, Co, Ba, Cu,) (Hamann et al., 2004). El zinc es uno de los dopantes metálicos más utilizados en Fe_3O_4 debido a su propiedad no magnética (Zhang et al., 2018).

Este tipo de espinelas son muy utilizados en la investigación y la industria, como es en el caso de catalizadores o dispositivos magnéticos, lo que genera mayor inquietud en sus propiedades y sobre todo si se logra agregar sustituyentes al hierro para poder obtener nuevas funcionalidades (Hamann et al., 2004).

Otro desafío que se presenta en la síntesis de este material es que son propensas a la aglomeración a causa a la alta proporción superficie/volumen (Gao et al., 2011).

Por esto, la síntesis solvotermal se proyecta como un método para resolver el problema de aglomeración ya que mantiene la uniformidad morfológica en virtud de su control de composición, alto rendimiento y condiciones de operación fáciles (Rajamathi & Seshadri, 2002).

La síntesis solvotermal es una técnica que consiste en que la reacción transcurra en un recipiente a presión, lo cual posibilita el calentamiento de disolventes por encima de sus puntos de ebullición normales y favorece las transformaciones de los precursores que a temperaturas bajas no transcurren, generando así las condiciones necesarias para que se produzcan las reacciones respectivas (Yang et al., 2007)

Quitosano

El quitosano es un derivado de la quitina que debido a sus propiedades fisicoquímicas presenta gran acogida en el campo científico (Rinaudo, 2006).

Es un biopolímero natural que es obtenido mediante la desacetilación parcial de la quitina, el cual es considerado como el segundo polímero natural más abundante del mundo (Honarkar & Barikani, 2009). En la ilustración 1 se observa su estructura, la que presenta



una D-glucosamina unida a N-acetil D-glucosamina por enlace β -1,4-glucosídico, cuya distribución o disposición de estos grupos está en función de la forma en la que se obtuvo (Chawla et al., 2015). La quitina se encuentra principalmente como el componente estructural de los exoesqueletos de crustáceos e insectos, así como en algunas paredes de células fúngicas (Xing et al., 2015). A escala comercial, la obtención del quitosano es principalmente de las conchas de crustáceos y cáscara de camarón (Philibert et al., 2017), obteniéndose diferentes grados de desacetilación que varían entre el 40% y 98% (Chawla et al., 2015).

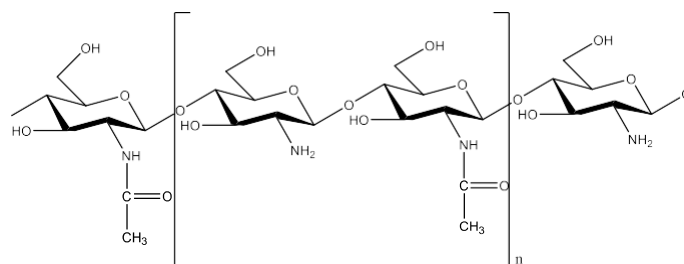


Ilustración 1. Molécula del quitosano

De las diferentes propiedades que exhibe el quitosano se pueden atribuir algunas a la presencia de los grupos funcionales dentro de su estructura, tales como el grupo amino, donde su reactividad está en el átomo C2 y el grupo hidroxilo en el átomo C3 y C6. Las características positivas de excelente biocompatibilidad, actividades inmunológicas, antibacterianas y ponderable biodegradabilidad con seguridad ecológica y baja toxicidad con actividades biológicas, brindan un gran campo de oportunidades para un mayor desarrollo de sustancias en presencia de quitosano (Chawla et al., 2015). A causa de su variedad de propiedades se lo está utilizando para desarrollar biofilms, hidrogeles, matrices poliméricas, recubrimientos, membranas, incluida la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos (Ghosh & Ali, 2012).

Propóleo

El propóleo es un producto natural resinoso de las colmenas, creado por las abejas melíferas mediante los capullos cortezas y secreciones de diferentes plantas. Este puede ser de color marrón a amarillo (Virga, 2018).

Es una sustancia que entrega varias propiedades medicinales. Muchos estudios han demostrado que el propóleo tiene gran cantidad de propiedades biológicas, como



antibacteriano, antiviral, antifúngico, antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígenos y puede promover el sistema inmune (Vázquez, 2010).

El propóleo presenta una actividad antimicrobiana contra muchas bacterias, levaduras y hongos Gram-positivos y Gram-negativos. Varias investigaciones indicaron que el propóleo tenía fuertes actividades antifúngicas contra patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*, *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*. (Peng et al., 2012).

La composición del propóleo depende de su ubicación geográfica y orígenes botánicos. Los componentes más activos del propóleo son ácidos aromáticos y compuestos fenólicos, especialmente flavonoides (como la pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona) y la galangina (3,5,7-trihidroxi-flavona)) mostrados en la ilustración 2, aldehídos, aminoácidos y ácidos fenólicos (Asawahame et al., 2014) responsable de sus propiedades biológicas. De manera general la composición del propóleo puede variar de acuerdo a lo enunciado en la Tabla 1.

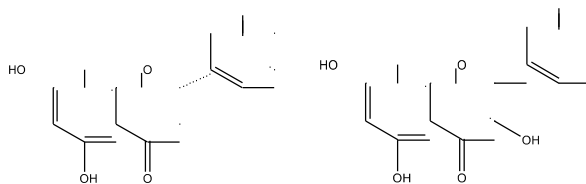


Ilustración 2. Moléculas de pinocembrina y galangina

Resinas y bálsamos	50-55%
Cera	25-35%
Aceites volátiles	10%
Polen	5%
Sustancias orgánicas y minerales	5%

Tabla 1. Composición química del propóleo (Galarza, 2013).

Compuestos activos en matrices de quitosano y liberación

En la actualidad, los sistemas que funcionan mediante un proceso de liberación controlada de activos van teniendo un mayor interés en el área de los agroquímicos y la investigación en general. La aplicación de estos productos se ha diversificado en distintas áreas de la agricultura, tal es el caso que se está utilizando en fertilizantes, pesticidas, insecticidas, entre otros.



Universidad de Cuenca

Una forma de controlar la cantidad de un compuesto adecuada para un cultivo es mediante la liberación controlada, lo que ayuda a encontrar un lugar adecuado y un tiempo óptimo para la liberación. Esto proporciona una mejor eficiencia en el activo, generando una extensión en el tiempo en que la dosis es efectiva (Daraio et al., 2012).

En la elaboración de sistemas de liberación controlada, hay un elevado número de polímeros que se utilizan. En forma general existen dos grandes grupos de polímeros:

- Polímeros naturales (quitosano, colágeno, albúmina)
- Polímeros sintéticos:
 - Polímeros biodegradables (ácidos poliláctico y poliglicólico)
 - Polímeros no biodegradables (ácidos poliacrílicos) (Expósito Harris, 2010).

El quitosano es un polímero natural que tiene un frecuente uso en sistemas de liberación. Al ser un polímero biocompatible y biodegradable, cuida el medio ambiente, evitando dejar en el suelo residuos tóxicos para las plantas. Esto le da una ventaja sobre poliuretanos y otros polímeros que se suelen utilizar para preparar matrices de liberación controlada (Daraio et al., 2012).

Ensayos de liberación

Los ensayos de liberación son procesos en donde se desarrollan modelos matemáticos para predecir el comportamiento de disponibilidad de un compuesto una vez administrado. De esta manera, los ensayos son importantes porque integran una parte fundamental dentro del desarrollo de una matriz porque tienen relación directa con la biodisponibilidad y bioequivalencia del elemento presente en la matriz con el medio en donde se libera (Fernández Aragón et al., 2009).

Las matrices de polímeros como el quitosano permiten la incorporación de otros componentes (orgánicos o inorgánicos), puede ser mediante la preparación de mezclas físicas o mediante la preparación de materiales híbridos orgánico-orgánico u orgánico-inorgánico, combinar sustancias pueden generar nuevas propiedades las cuales serían de gran interés en el campo de la liberación de principios activos (Pardini, 2010).



Modelos matemáticos

Los modelos matemáticos de liberación permiten predecir la cinética de disolución/liberación de los principios activos para desarrollar un sistema de liberación controlada. Constan de una ecuación matemática la cual relaciona varios parámetros y predice la cantidad del compuesto en el medio. Estos facilitan el análisis cuantitativo de los resultados de los ensayos de liberación y describen el mecanismo de liberación (Expósito Harris, 2010)

Modelo de Higuchi

Este modelo plantea la liberación de fármacos como un proceso de difusión a través del polímero en donde se considera que la sustancia a liberarse es soluble en todo momento. La difusión se basa en la ley de Fick, que depende de la raíz cuadrada del tiempo. En la ecuación 1 se muestra la expresión del modelo de Higuchi:

$$y = k\sqrt{t}$$

Ecuación 1. Modelo de Higuchi

Donde y es la cantidad de fármaco liberado, k es la constante de disolución de Higuchi y t es el tiempo en que se libera el fármaco

Modelo de Korsmeyer-Peppas

Es un modelo semionérico que correlaciona la liberación del compuesto activo con el tiempo a través de una ecuación exponencial. Se propone que el mecanismo de difusión se desvía de la difusión Fickiana. Este modelo es útil cuando se desconoce el mecanismo de liberación o cuando ocurre por más de un mecanismo. En la ecuación 2 se muestra la expresión de este modelo.

$$y = kt^n$$

Ecuación 2. Modelo de Korsmeyer-Peppas

Donde y es la fracción de fármaco liberado (M_t/M_{inf}), k es la constante del sistema y n es el exponente difusional. Dependiendo de los valores que tome n se puede proponer distintos mecanismos de transporte como se observa en la siguiente tabla:

Exponente de liberación (n)	Mecanismo de transporte
<0.5	Difusión a través de la matriz hinchada y a través de los poros
0.5	Difusión Fickiana (Modelo de Higuchi)
0.5<n<1	Mecanismo de difusión anómalo (no Fickiano)
1	Caso límite de transporte no Fickiano (Cinética de orden 0)
>1	Tiempo de liberación elevado

Tabla 2. Mecanismo de transporte por Korsmeyer-Peppas



CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

Materiales

El propóleo utilizado fue donado por la compañía “Dr. Abeja” la cual es propiedad del Dr. Luis Galarza. Esta empresa está ubicada en la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay-Ecuador. Se utilizó quitosano (CS) de peso molecular medio (<75% grado de desacetilación) de la casa comercial SIGMA, etanol de grado absoluto, ácido acético glacial, ambos de la casa comercial J.T Baker, acetato de sodio, precursor de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), precursor de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /Zn metálico). Se utilizó agua desionizada y todos los demás reactivos utilizados son de grado analítico.

Métodos

Extracción del propóleo

Se pesó 10 g de propóleo crudo, los cuales se sometieron a extracción exhaustiva con etanol absoluto (durante 48 h, a temperatura ambiente y en oscuridad). Luego, el material se filtró en un embudo con papel de filtro. A los filtrados combinados se les eliminó las ceras mediante precipitación con la adición de 5 ml de agua destilada y refrigeración del extracto a -5°C . Posteriormente, se evaporó el solvente de los filtrados en una estufa a presión reducida y temperatura de 50°C . El extracto de propóleo (EEP) se almacenan en viales ámbar refrigerados a -5°C hasta su aplicación (Dionisio et al., 2013).

Síntesis solvotermal

Se disolvieron 12 mmol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 6 mmol $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de etanol absoluto y posteriormente se agregaron 18 mmol de CH_3COONa a la mezcla. Después se agitó vigorosamente aproximadamente 5 minutos y la mezcla se transfirió a una autoclave de acero revestido con teflón por un tiempo y temperatura definidos. Luego se enfrió el reactor a temperatura ambiente y se realizó el lavado de los productos sólidos mediante centrifugación con etanol/agua desionizada. Luego, las nanopartículas (Nps) se secaron a 50°C a presión reducida durante 24 h en una estufa (C. Wu et al., 2019).



Electrospinning

Las soluciones poliméricas de CS, CS/EEP, CS/Nps y CS/EEP/Nps se prepararon a partir de (CS) comercial de <75% de grado de desacetilación utilizando como solvente una solución de ácido acético al 90% v/v. Se utilizó parte de la solución de ácido acético para disolver al EEP y también, para sonicar las nanopartículas que se encuentran al 20% y 1% en relación al peso del polímero, respectivamente. Luego se mezclaron las soluciones poliméricas dependiendo de su composición y finalmente se realizó un baño ultrasónico por 1 hora, todo esto a la nueva solución. (Viñanzaca, 2019).

Las matrices poliméricas se fabricaron a partir de soluciones poliméricas en un equipo de Electrospinning Tong Li TL-01. Para establecer parámetros operacionales se estudiaron variables como: voltaje aplicado, flujo, calibre de la aguja y distancia de la aguja al colector. Se realizó una prueba de experimentación con soluciones de CS a concentraciones de 0,6%, 0,8%, 1%, 1,25%, 1,5% y 2% p/v hasta encontrar la combinación que mejor se ajuste a los parámetros del equipo, es decir, aquella que forme un chorro uniforme desde la punta de la aguja hasta el colector. De esta manera se utilizó un voltaje de 23 kV, flujo de 1ml/h, calibre de aguja de 8 y distancias de trabajo entre la aguja y el recolector de 10 cm. (Reinaldo & Tamay, 2019).

Espectroscopía Ultravioleta–Visible (UV-Vis)

Se realizó el análisis UV-Vis al EEP y a las Nps en el equipo Thermo Scientific GENESYS 10s con el objetivo de determinar el máximo de absorción y construir las curvas de calibración a esa longitud de onda. En el caso de las Nps se prepararon soluciones de concentraciones conocidas, utilizando como solvente agua y etanol al 70%, cada solución fue sometida a baño ultrasónico durante 15 minutos y a temperatura ambiente. Posterior a esto se colocó la muestra en una celda de cuarzo y se realizó la lectura en el equipo. Por otro lado, para el EEP se realizaron soluciones de concentraciones conocidas en etanol al 70%, se traspasó la solución a una celda de cuarzo y se realizó la lectura en el equipo.



Ensayos de sedimentación

Se realizó el ensayo de sedimentación preparando soluciones de 100 ppm de las muestras de nanopartículas JMS1, JMS3, JMS5, JMS7, JMS8 en agua destilada las cuales fueron sonicadas por 30 minutos. Luego se traspasaron 100 ml de cada solución a un vaso de precipitación 100 ml de capacidad y se tomaron alícuotas a una misma altura y a tiempos de 30 min, 1h y 30 min, 3 h, 4 h y 5h y 45 min. Finalmente se cuantificó por UV-Vis en el máximo de absorción.

Ensayos de liberación

Para realizar los ensayos de liberación se determinaron los máximos de absorción del EEP y de las Nps. Posteriormente, se construyeron las curvas de calibración respectivas a concentraciones de 5, 10, 20, 50, 100 ppm utilizando etanol al 70% como solvente. Luego, se pesaron 30 mg de cada matriz polimérica sintetizada y se colocaron en agitación, en 50 ml de una solución de etanol al 70 % a una temperatura de 30 y 40 °C en un equipo Shaker. Se tomaron alícuotas de las soluciones agitadas durante intervalos de tiempo de: 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos las cuales fueron evaluadas por UV-Vis en el máximo de absorción.

Ensayos de estabilidad

Para los ensayos de estabilidad primero se pesaron 20 mg de las diferentes matrices poliméricas (CS, CS/Nps, CS/EPP, CS/Nps/EPP) las mismas que se sometieron 40 ml de una solución ácida de agua con ácido nítrico (pH 1).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para el análisis DSC se pesaron 5 a 10 mg de las diferentes matrices poliméricas y propóleo, los cuales se colocaron en un crisol de aluminio haciéndole un agujero en el mismo. Las muestras se sometieron a una rampa de calentamiento de 10°C/min desde 30°C a 380°C, con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min. Para esto, se utilizó un METTLER TOLEDO™ High Temp Differential Scanning Calorimeter (DSC)

Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (IRTF)

Se realizó el análisis de espectroscopia infrarrojo a las diferentes matrices poliméricas, nanopartículas y sobrenadantes, en un equipo Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™ 5, con un barrido desde 4000 cm⁻¹ hasta 600 cm⁻¹. En el caso de las matrices poliméricas se quería



Universidad de Cuenca

determinar las vibraciones moleculares de los compuestos presentes en cada una de ellas. Por otro lado, en el caso de las Nps se buscaba encontrar vibraciones de enlaces entre el oxígeno con alguno de los metales utilizados en la síntesis (Fe/Zn) que aparecen por lo general en la región del infrarrojo lejano. Por último, se realizó el IRTF de los sobrenadantes buscando restos de los precursores que se utilizaron en la síntesis.

Difracción de rayos X (DRX)

Las difracciones de DRX se registraron utilizando un difractómetro Bruker AXS D8 ADVANCE con radiación de Cu-K α a temperatura ambiente. El programa Fullprof y Excel fueron empleados para analizar los datos del DRX. Este análisis se realizó para las nanopartículas con mayor posibilidad de tener carácter cristalino.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se realizó las micrografías de transmisión electrónica para las nanopartículas con el objetivo de determinar el tamaño y forma de las mismas. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1,200 EX II, con 4 Å de resolución y operado a 120 kV y a temperatura ambiente.

Difracción de electrones de área seleccionada (SAED)

Se realizó las micrografías de transmisión electrónica para las nanopartículas con el objetivo determinar los planos cristalográficos que se presentan. El equipo utilizado fue el mismo que se usó en el análisis MET con parámetros de trabajo similares.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se realizó el análisis de MEB en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JEM 63 80 LV que está adaptado con un analizador INCA de Oxford Instrument© con acelerador de voltaje de 20 kV. Las muestras analizadas fueron las diferentes matrices poliméricas, para ello se colocó cada una en un portamuestra de cobre y finalmente se realizó un recubrimiento de oro (*sputtering*), para medir el tamaño y determinar la morfología de las nanopartículas y la distribución de los elementos.

Ensayos *in-vitro*

Las matrices poliméricas se cortaron en segmentos y se desinfectaron usando alcohol 70%, aplicado por aspersión, sobre cada fragmento de fibra contenido en una caja Petri, el



exceso de alcohol se eliminó inclinando la caja y las fibras aún húmedas se colocaron bajo luz ultravioleta por 1 hora. Posteriormente, en una campana de flujo laminar, las fibrassecas fueron desprendidas de la caja Petri y colocadas en medio de cultivo PDA, previamente esterilizado en autoclave a 120°C por 20 minutos y en condiciones estériles. Simultáneamente, se sembró en cada caja que contenía fibra, un fragmento de 0,5 cm² de medio de cultivo PDA que contenía el micelio del hongo *Fusarium sp.* Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente.

Para los análisis con las soluciones (soluciones que se utilizaron en el *electrospinning*) se preparó un medio de cultivo PDA agregando las diferentes soluciones para evaluar una concentración al 2% (1 ml solución en 50 ml de Medio PDA), se esterilizó en autoclave a 120 grados °C por 20 minutos y se dispensó en cajas Petri en condiciones estériles. Sobre las cajas en las que el medio de cultivo gelificó (Tratamiento con solución EEP y Etanol al 70%) se sembró un fragmento de 0,5 cm² de medio de cultivo PDA que contenía el micelio del hongo *Fusarium sp.* (Raquel & Lucila, 2015). Para los tratamientos que no permitieron que el medio gelifique (todos los que contenían ácido acético), se preparó un nuevo medio de cultivo PDA, se esterilizó y dispense como se describió anteriormente, sobre la superficie del medio gelificado se agregaron 100 µl del medio de cultivo líquido, que no gelifico luego de la esterilización, es decir del primer medio elaborado al que se le agregaron las diferentes soluciones en una concentración al 2%. Luego de dispensar y homogenizar la solución con un asa estéril, se sembró un fragmento de 0,5 cm² de medio de cultivo PDA que contenía al hongo objeto de análisis. Las cajas de incubaron a temperatura ambiente (Kaur et al., 2018).



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de Nps de Zn-Fe

En la tabla 3 se describen los experimentos realizados para la síntesis de Nps de Zn-Fe las cuales, así como los parámetros de reacción y precursores utilizados.

Código	Parámetros de reacción	Precursores
JMS1	T=200°C; t=24 h	Zn; FeCl ₃ *6H ₂ O
JMS2	T=200°C; t=24 h	Zn(NO ₃) ₂ *6H ₂ O; FeCl ₃ *6H ₂ O
JMS3	T=200°C; t=24 h	Zn(NO ₃) ₂ *6H ₂ O; FeCl ₃ *6H ₂ O
JMS4	T=180°C; t=24 h	Zn(NO ₃) ₂ *6H ₂ O; FeCl ₃ *6H ₂ O
JMS5	T=200°C; t=8 h	Zn(NO ₃) ₂ *6H ₂ O; FeCl ₃ *6H ₂ O
JMS6	T=200°C; t=16 h	Zn(NO ₃) ₂ *6H ₂ O; FeCl ₃ *6H ₂ O
JMS7	T=160°C; t=24 h	Zn(NO ₃) ₂ *6H ₂ O; FeCl ₃ *6H ₂ O
JMS8	T=200°C; t=24 h	FeCl ₃ *6H ₂ O

Tabla 3. Síntesis de nanopartículas y sus parámetros

Extracción de los compuestos fenólicos a partir de propóleo

Masa propóleo crudo (g)	Masa propóleo refinado (g)	Rendimiento obtenido
10,132 g	3,4692 g	34,24%

Tabla 4. Refinamiento del propóleo

Según la tabla 4 el porcentaje de extractables en etanol es del 34% resultado que va acorde con los resultados obtenidos por Rene Dionisio, en el que se estipula que una buena extracción corresponde a valores superiores al 30%, siendo los compuestos extraíbles resinas y fenoles (Dionisio et al., 2013).

Electrospinning

Para tratar de obtener el mejor resultado en el electrohilado, se determinó la concentración óptima de CS mediante ensayos previos, a diferentes concentraciones. En esta prueba se sometió a electrohilado soluciones de CS a 0,6%, 0,8%, 1%, 1,25%, 1,5% y 2% p/v, y se analizaron variables como la uniformidad del flujo y el aspecto físico de la fibra obtenida (presencia de gotas en la fibra). Se varió el caudal y el voltaje hasta encontrar el que mejor se ajuste al proceso. Además, se evaluó de forma visual los parámetros de trabajo del *electrospinning* y de cada matriz polimérica obtenida, para esto se estableció una escala visual del 1 al 5, donde 5 representa las mejores condiciones de trabajo y 1 lo más deplorable. En la tabla 5 se observa los resultados obtenidos.



[]cs (%p/v)	Fluidez			Aspecto físico
	Calificación cono de Taylor	Flujo de trabajo (ml/h)	Voltaje (kV)	
0,6%	3	0,7	19	3
0,8%	4,5	1	23	4
1%	3,5	0,5	18	3
1,25%	3	0,5	17	2
1,5%	2	0,3	16	2
2%	1	0,3	16	1

Tabla 5. Evaluación de parámetros para electrospinning

Mediante este análisis se determinó que la mejor concentración para el *electrospinning* es 0,8% p/v de quitosano en ácido acético al 90%, con un flujo de 1 ml/h y un voltaje de 23 kV, todo esto con una velocidad de rotación del tambor de 500 rpm y una aguja calibre número 8.

Espetroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Nanopartículas de Zn-Fe

Para realizar la lectura en el equipo UV-Vis se dispersaron las partículas en agua destilada por 30 minutos. En las ilustraciones 3, 4, 5, 6 y 7 se observan los espectros para las síntesis JMS1, JMS3, JMS5, JMS7, JMS8 los cuales exponen un pico de absorbancia de 265 nm, 892 nm, 857 nm, 664 nm y 880 nm respectivamente. El espectro y valor máximo de absorbancia para la muestra JMS1 es muy similar al reportado por Vinosha (Vinosha et al., 2017), y esta absorción es producido por la excitación del plasmón de las nanopartículas de Fe₃O₄ (Arockia Jency et al., 2020). Asimismo, se puede visualizar en el mismo espectro un hombro a 360 nm atribuido al ZnO (Ghorbani et al., 2015). Las muestras JMS3, JMS5 JMS7 y JMS8 manifestaron absorbancia entre 300-350 nm a causa del ZnO, así como un pico entre los 560 nm esto debido a la presencia de la estructura Fe₂O₃ (Joya et al., 2013) (Bhunja & Saha, 2013). Además, estos mismos espectros poseen una región de mayor absorbancia a las anteriores entre 850-890 nm la que se forma gracias a la interacción entre el Fe₂O₃ y el ZnO. Estas estructuras, al estar juntas, absorben luz a longitudes de onda inferiores produciéndose un desplazamiento hacia el rojo del máximo de absorción (Güler et al., 2016) (Li et al., 2018). Aun así, esta zona se utilizó para realizar las curvas de calibración de estas muestras ya que presentaba una buena linealidad con respecto a la concentración de nanopartículas. Se realizaron las matrices poliméricas con la síntesis JMS3 por lo que en la prueba de sedimentación exhibió una buena estabilidad



como coloide y por ser la síntesis de partida para este trabajo de titulación.

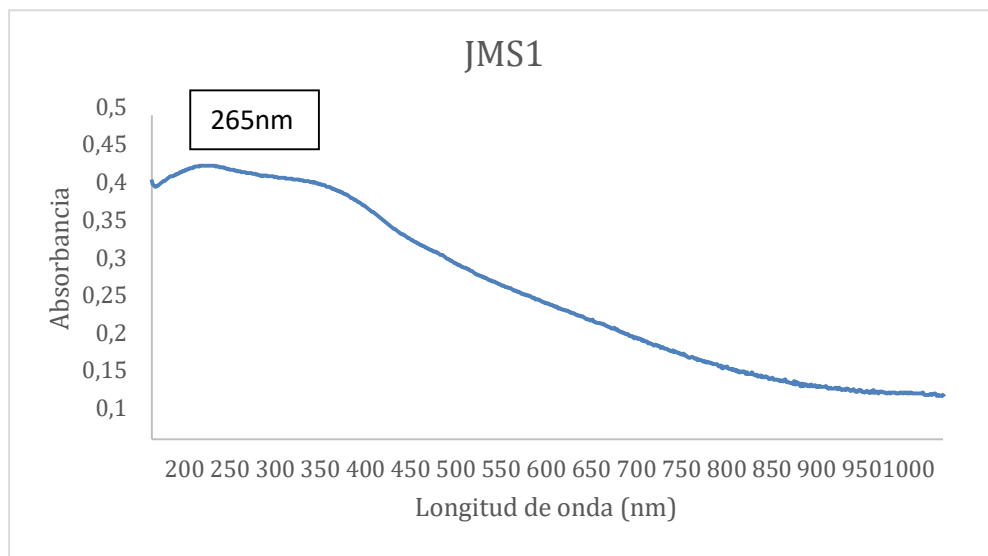


Ilustración 3. Espectro UV-Vis de la síntesis JMS1 en agua

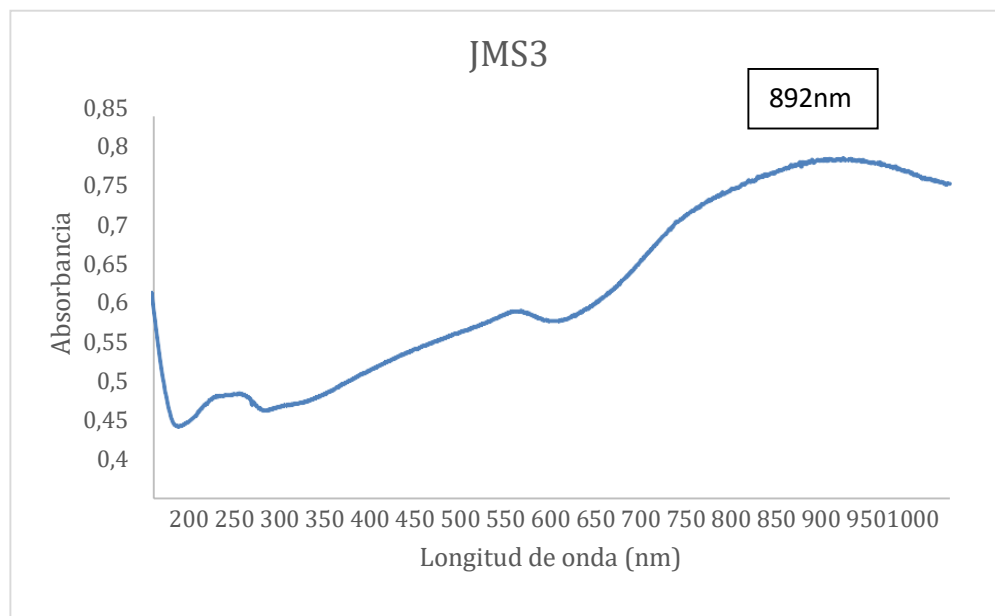


Ilustración 4. Espectro UV-Vis síntesis JMS3 en agua

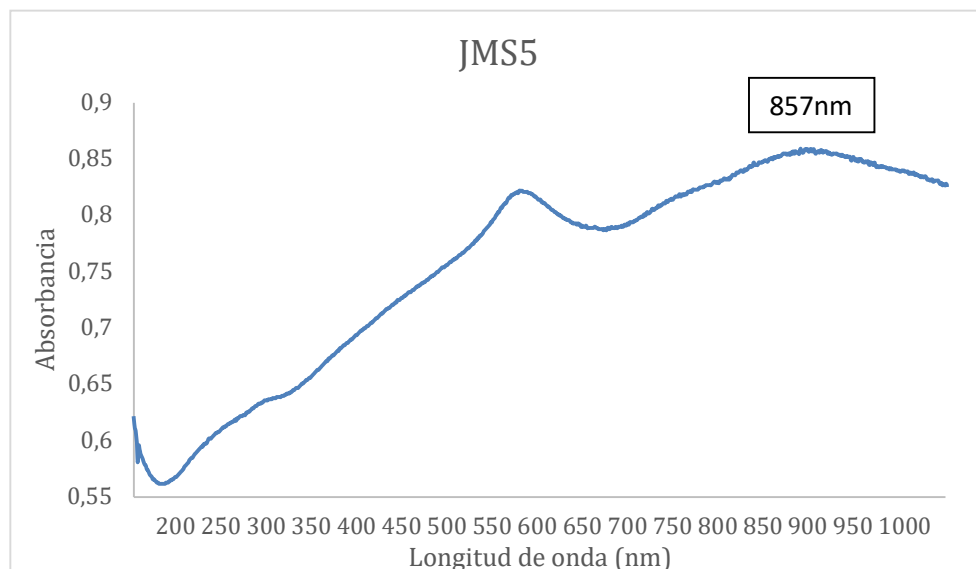


Ilustración 5. Espectro UV -Vis síntesis JMS5 en agua

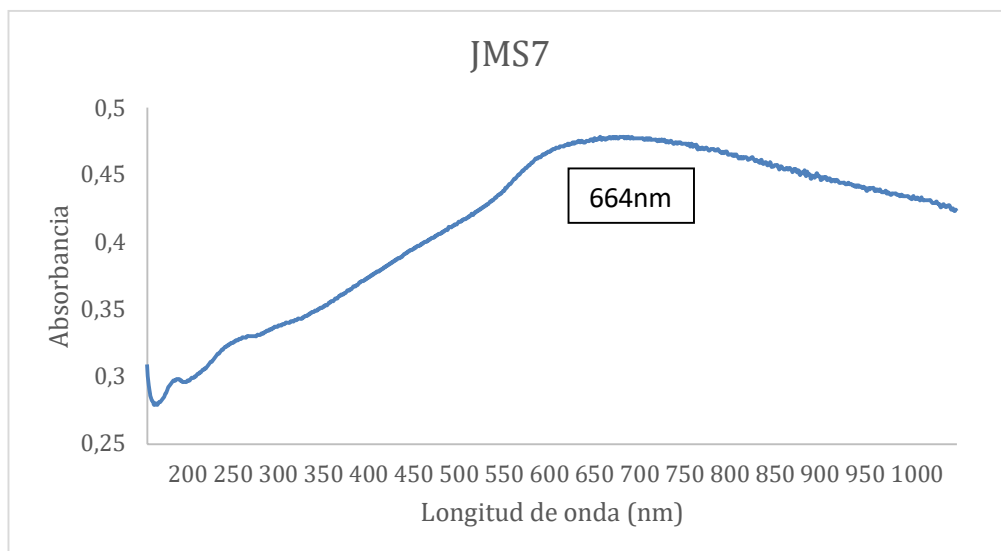


Ilustración 6. Espectro UV-Vis Síntesis JMS7 en agua

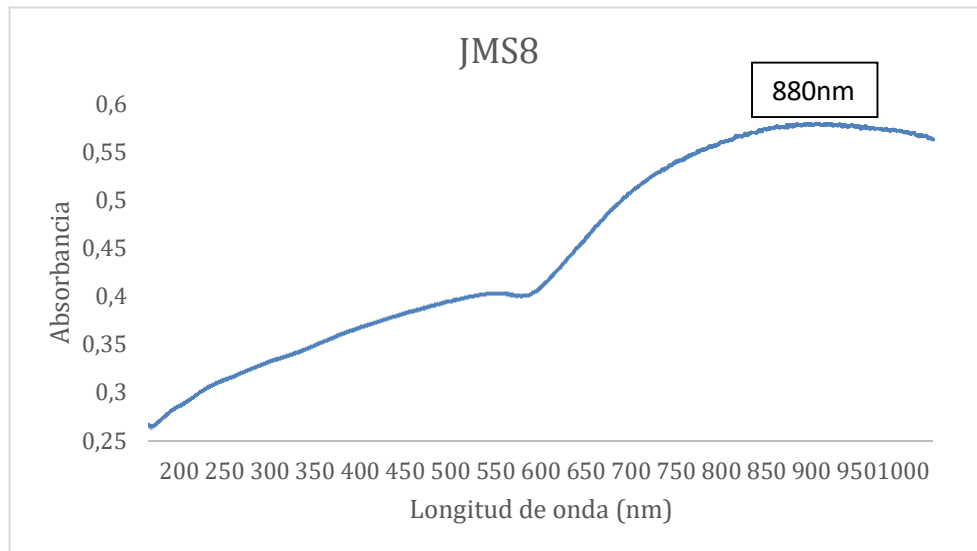


Ilustración 7. Espectro UV-Vis síntesis JMS8 en agua

Extracto de Propóleo

En el espectro del extracto de propóleo (ilustración 8) se observan 2 picos: uno a 205 nm y el otro a 293 nm. Según el perfil de absorción se atribuye el pico alrededor de 205 nm a la presencia de ácidos hidroxibenzoicos (como el ácido gálico), mientras que el pico a 293 nm es asignado a la existencia de ácidos hidroxicinámicos (como el ácido ferúlico). Ambos grupos pertenecen a los compuestos fenólicos presentes en el propóleo (Paula et al., 2017). Así mismo, en otras investigaciones (Gregoris & Stevanato, 2010) (B. B. Silva et al., 2008) se ha evidenciado la formación de un pico con valores cercanos al de 290 nm. Para realizar la curva de calibración para los ensayos de liberación se tomó en cuenta el pico a 293 nm debido a que en los barridos espectrales no hubo desplazamiento del mismo, además de que el etanol tiene su pico de absorbancia alrededor de los 200 nm.

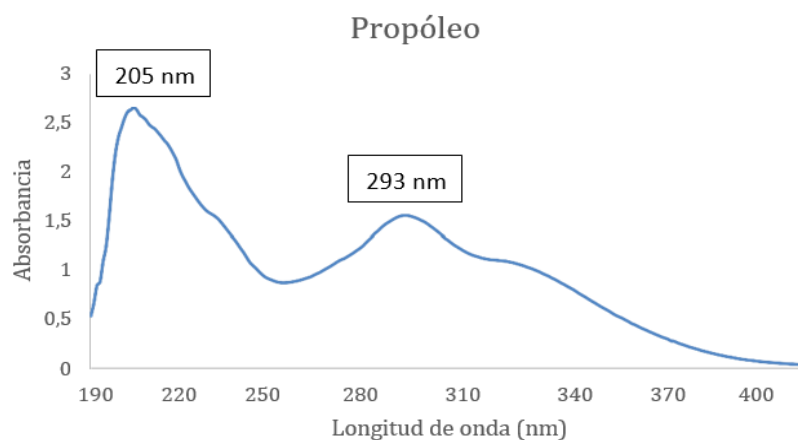


Ilustración 8. Espectro UV – Vis del extracto de EEP en etanol al 70%



Análisis DSC

Matrices poliméricas de CS, CS/EP, CS/Nps, CS/EP/Nps

En la ilustración 9 se puede observar los diferentes termogramas obtenidos para las matrices poliméricas. El rango de temperatura de barrido fue de 89-105 °C donde se aprecia un pico endotérmico el cual se asocia a la evaporación del agua (pico 1), la cual forma puentes de hidrógeno con los enlaces -NH₂ del CS (Suriyatem et al., 2018).

En el mismo rango de temperatura se contempla un aumento en el valor de la integral normalizada en la matriz polimérica CS/Nps (-354,26 J/g, ilustración 65) con respecto a la matriz polimérica de CS (-348,67 J/g, ilustración 64) lo cual se debe a un aumento del contenido de agua en la matriz polimérica de CS/Nps ya que las nanopartículas afecta a la continuidad de la matriz polimérica, lo que permite una mayor inclusión del agua (Meng et al., 2009).

Así mismo, en las matrices poliméricas con propóleo (CS/EEP y CS/EEP/Nps) se determinó una disminución del valor para el pico endotérmico por evaporación del agua (-282,07 J/g y - 295,79 J/g, ilustración 64 y 66) con respecto al de la matriz polimérica de CS (-348,67 J/g) a causa de la interacción de los enlaces amino del quitosano con el propóleo. Además, no se observaron fenómenos propios del propóleo por la encapsulación de la molécula en la matriz polimérica (T. G. Da Silva et al., 2016).

Si se analiza la temperatura a la que se presenta el pico 1 en las diferentes matrices poliméricas se visualiza que para las matrices poliméricas CS/Nps, CS/EEP y CS/EEP/NPS la temperatura a la que se encuentra este pico (101,1, 99,08 y 89,97°C respectivamente, , ilustración 65, 64 y 66) disminuye con respecto a la matriz polimérica CS (104,11 °C, ilustración 64) denotando una mayor facilidad de la eliminación del agua debido a que esta no interactúa por puentes de hidrógeno con el quitosano de la matriz polimérica.



En los termogramas también se visualiza un pico exotérmico en el rango de temperatura de 282 a 292°C el cual se asocia a la temperatura de descomposición (t_d) del quitosano. Para la matriz polimérica de CS/Nps existe una disminución de la t_d (282,88°C, ilustración 65) con respecto a la t_d de la matriz polimérica de CS (284,1°C, ilustración 64) la cual se relaciona con el cambio de morfología que sufre el polímero por la inclusión de las nanopartículas. En las matrices poliméricas que contienen propóleo (CS/EEP y CS/EEP/Nps) se observa un aumento de esta temperatura con respecto a la matriz polimérica de CS (293,07°C y 288,62°C respectivamente, ilustración 64 y 66) el cual se asocia a la energía extra que se necesita para romper los enlaces hidrógeno formado entre el CS y el EEP.

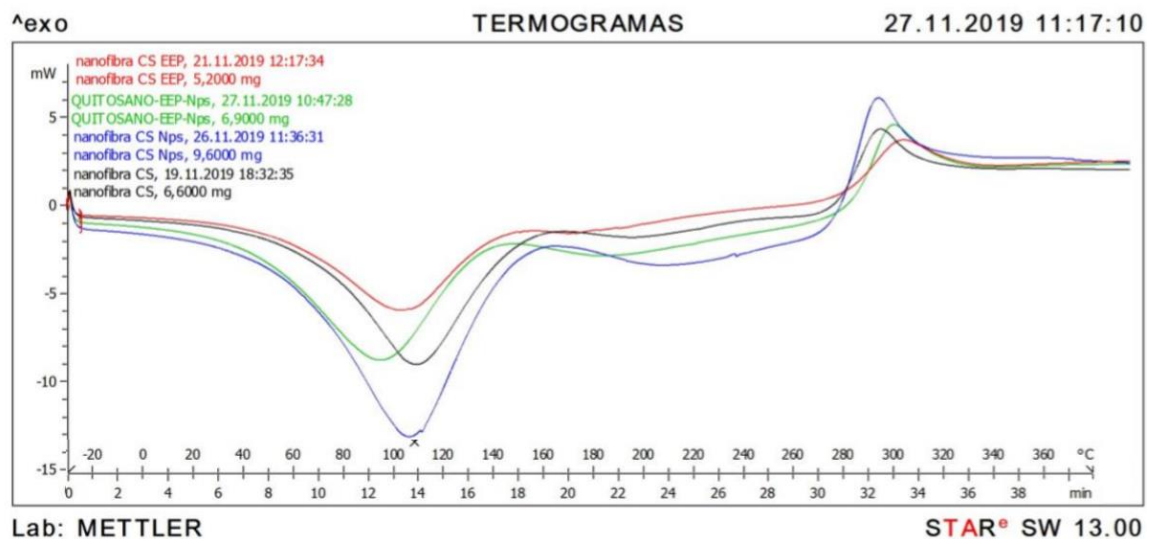


Ilustración 9. Termograma de las matrices poliméricas de CS, CS/EEP, CS/Nps, CS/EEP/Nps

En la ilustración 10 se observa el DSC realizado al EEP en el cual se observa un pico endotérmico (108,37 °C) el cual se asocia a procesos de fusión de bajo peso molecular como compuestos fenólicos los cuales están presentes en el EEP. En ninguna matriz polimérica se presenta este fenómeno endotérmico lo cual sugiere un fenómeno de encapsulación del propóleo en la matriz polimérica (T. G. Da Silva et al., 2016).

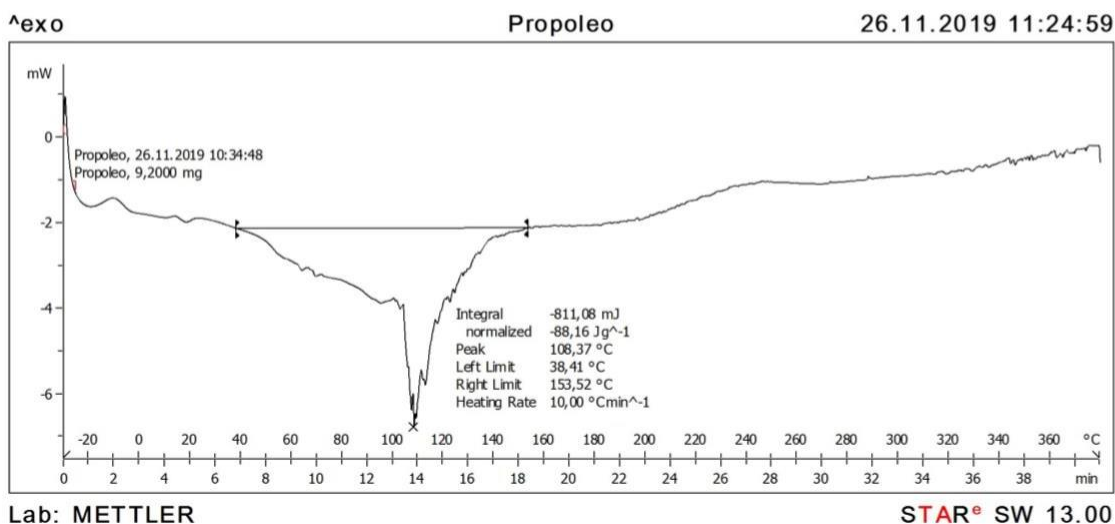


Ilustración 10. Termograma para el EEP utilizado para la síntesis de las matrices poliméricas

Identificación de grupos funcionales por Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (IRTF)

Se analizaron por espectroscopía IRTF las matrices poliméricas de CS, CS/EEP, CS/Nps, CS/EEP/Nps (ilustración 11), con este ensayo se pretende ver el movimiento vibracional de los grupos funcionales presentes y, analizando la intensidad de los mismos, sugerir interacciones de enlaces entre los compuestos contenidos en cada matriz polimérica. En la ilustración 11 se presenta el espectro infrarrojo de todas las matrices poliméricas en conjunto, el mismo que sirve para comparar las vibraciones que aparecen, incrementan o decrecen entre un espectro u otro, pudiendo así determinar la interacción entre los compuestos que conforman cada matriz (Viñanzaca, 2019).

Los espectros IR de las matrices poliméricas y nanopartículas mostraron diferentes bandas vibracionales, en donde cada número de onda corresponde a la vibración molecular de un tipo de enlace o grupo funcional presente en la muestra. Entre los principales grupos funcionales que se detectaron en las fibras son: 3500 a 3300 cm⁻¹ correspondientes al estiramiento N-H (NH₂), 3400 a 3200 cm⁻¹ por el estiramiento del enlace O-H, 3000 a 2850 cm⁻¹ a causa del estiramiento C-H (CH₂, CH₃), 1733 a 1539 cm⁻¹ atribuido al estiramiento atribuido a la amida primaria (estiramiento C=O) y 1280 a 1000 cm⁻¹ causado por la vibración NH (amina) atribuida a la amida secundaria (vibración NH) (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016) (Cortés Higareda et al., 2019) (Correa Pacheco et al., 2019) (Silva Castro et al., 2018).

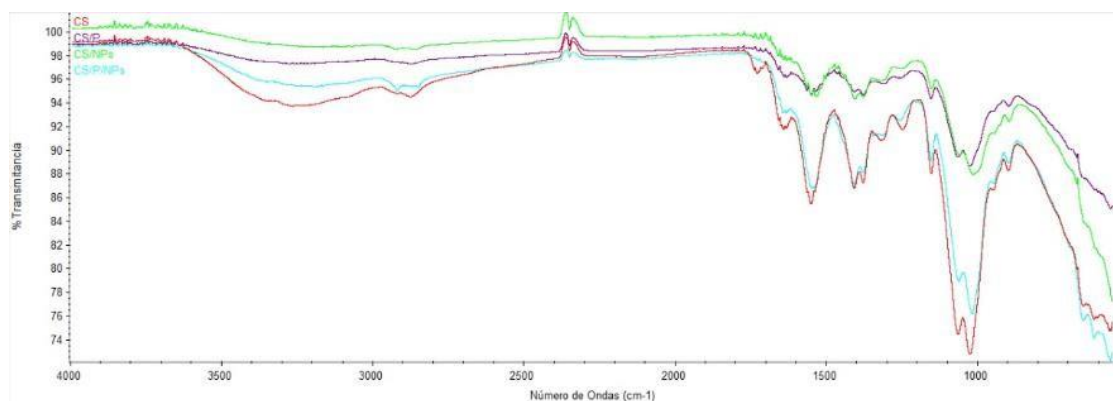


Ilustración 11. Espectros IR de las matrices poliméricas analizadas: CS en rojo, CS/EEP en morado, CS/Nps en verde y CS/EEP/Nps en celeste.

En la ilustración 12 se presenta el espectro IR del EEP, este presenta las bandas a los 2924 cm^{-1} , vibración causada por el alargamiento asimétrico del enlace C-H de grupos CH_2 de saturación, 1447 cm^{-1} , vibración de flexión provocada por el enlace C-H, a 1156 cm^{-1} , vibraciones que se deben al enlace C-O y C-OH, a 1512, 1600 y 1630 cm^{-1} , tenemos bandas de vibración de alargamiento de anillos aromáticos y a 1689 cm^{-1} , causada por la vibración de flexión asimétrica del C=O de los lípidos y flavonoides, por último en el rango de 900–690 cm^{-1} , se encuentran las vibraciones de estiramiento y flexión del enlace C-H de los anillos aromáticos, las cuales también se atribuyen a compuestos fenólicos que se encuentran presente en el propóleo (Franca et al., 2014) (C. Da Silva et al., 2018) (Delgado et al., 2014).

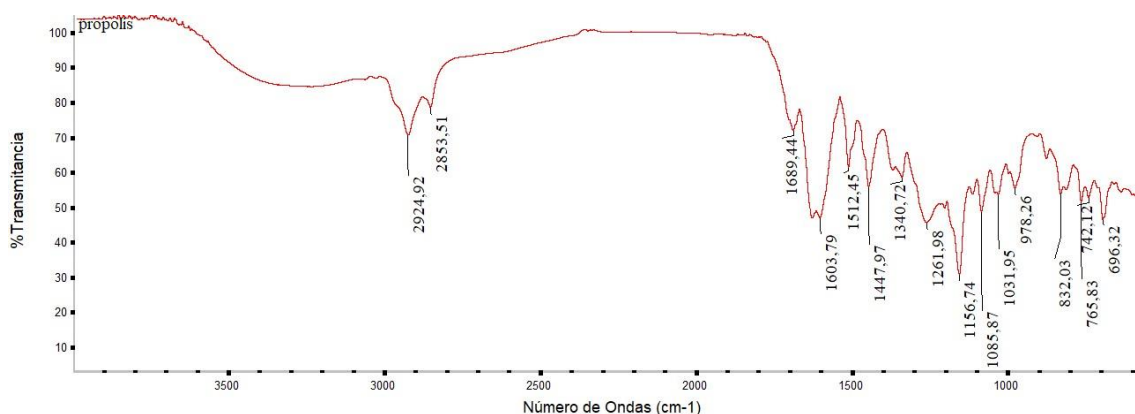


Ilustración 12. Espectro IR del EEP.

Si se compara los espectros IR del EEP y las matrices poliméricas, se concluye que, por la disminución de la intensidad de las vibraciones, se indicaría la interacción entre los componentes. En la vibración entre 2900-2950 cm^{-1} se visualiza una disminución de la intensidad, lo que sugiere la unión de hidrógeno entre el quitosano y el propóleo (Matei



et al., 2015).

Asimismo, entre los espectros de las matrices poliméricas, se visualiza una disminución en la intensidad del movimiento vibracional del enlace amino del quitosano ($3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$) si se comparan los espectros de la matriz CS con los de las matrices CS/EEP, CS/Nps y CS/EEP/Nps por lo que, tanto el EEP como las Nps, interactúan con este enlace.

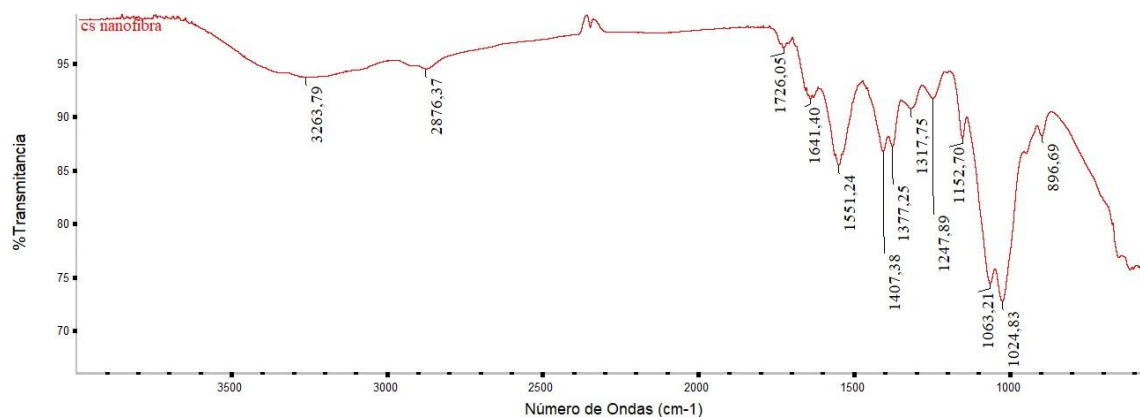


Ilustración 13 Espectro IR de la matriz polimérica de CS

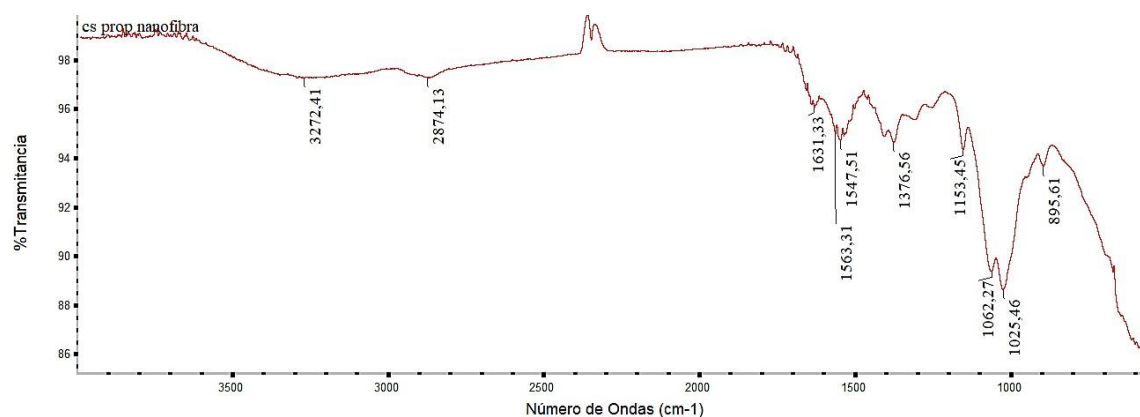


Ilustración 14. Espectro IR de la matriz polimérica de CS/EEP

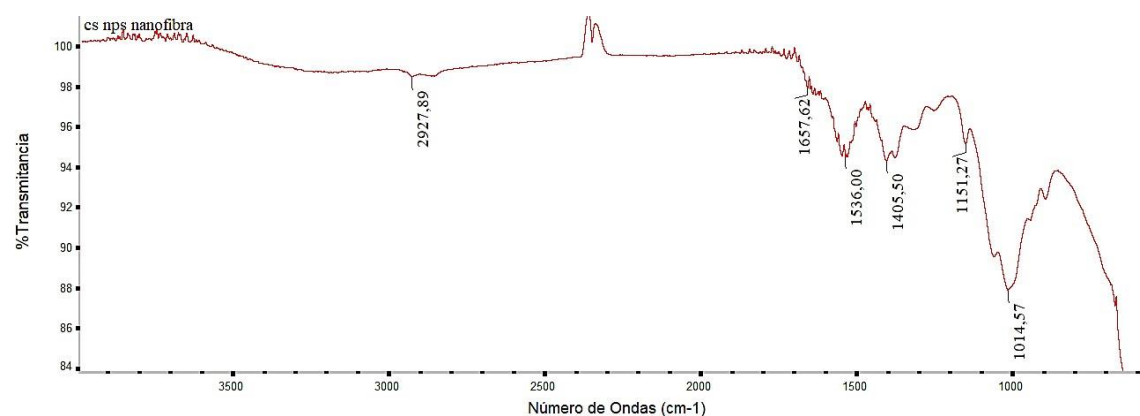


Ilustración 15. Espectro IR de la matriz polimérica de CS/Nps

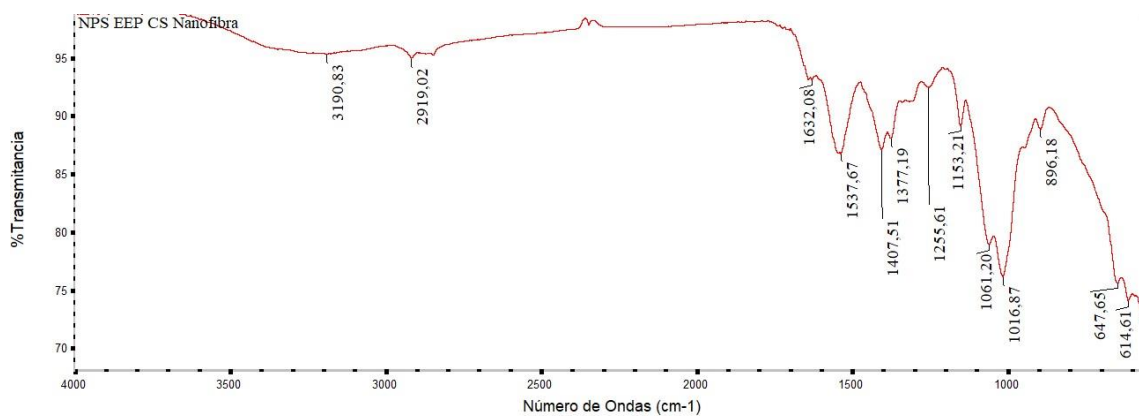


Ilustración 16. Espectro IR de la matriz polimérica de CS/EEP/Nps

Si se observan las ilustraciones 13, 14, 15 y 16, se identifica que hay cambios en el espectro infrarrojo de las matrices poliméricas cuando se añade EEP y Nps, si se analizan y comparan las fibras CS/EEP/Nps con respecto a la de CS, se reconoce que el pico a 2876 cm^{-1} se desplaza con respecto al CS, de la misma manera la intensidad del pico varía, lo que sugiere que existen interacciones entre los C-H de quitosano y propóleo (Espinosa Ávila, 2015).

Una vibración a resaltar es que exhibe a 1726 cm^{-1} en la matriz polimérica CS (ilustración 13) la cual desaparece en los otros espectros de las matrices poliméricas. Esta vibración se le atribuye al estiramiento del carbonilo (C=O) del grupo amida y la presencia de EEP y Nps impide el movimiento vibratorio de este enlace por lo que no se muestra en los otros espectros (Franca et al., 2014) (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016).

Las nanopartículas también fueron sometidas al ensayo de IRTF (ilustraciones 18, 19 y 20), de manera que se presencié un pico entre los $1650\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ que es asignable a un grupo carbonilo, el mismo que se forma por la reducción del acetato de sodio durante la reacción quedando adherido en la estructura de la nanopartícula (ilustración 17). El pico entre $2400\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$ es producido por el estiramiento asimétrico el CO_2 adsorbido durante el análisis en la preparación de la muestra (Benhammada et al., 2020).

La banda presente entre los $680\text{-}670\text{ cm}^{-1}$ aparece en todos los espectros anteriores (incluido las matrices poliméricas y sobrenadantes) por lo que no se puede afirmar que sea producido por la vibración oxígeno-metal. Por lo general estas vibraciones se presentan en el espectro infrarrojo lejano a números de ondas entre $500\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ (Muñoz Sandoval, 2017) (Liu et al., 2019). Por IRTF, no es posible establecer la presencia de metales directamente, pero si se puede obtener información mediante la vibración que



sufre el oxígeno al estar al lado de un metal. (Cárdenas Triviño & Cruzat Contreras, 2018) (Rodriguez Martinez et al., 2011).

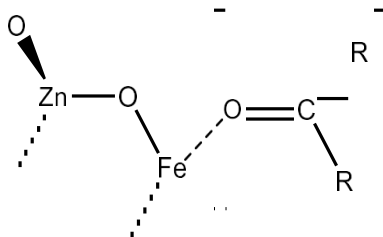


Ilustración 17. Propuesta de la retención del enlace carbonilo

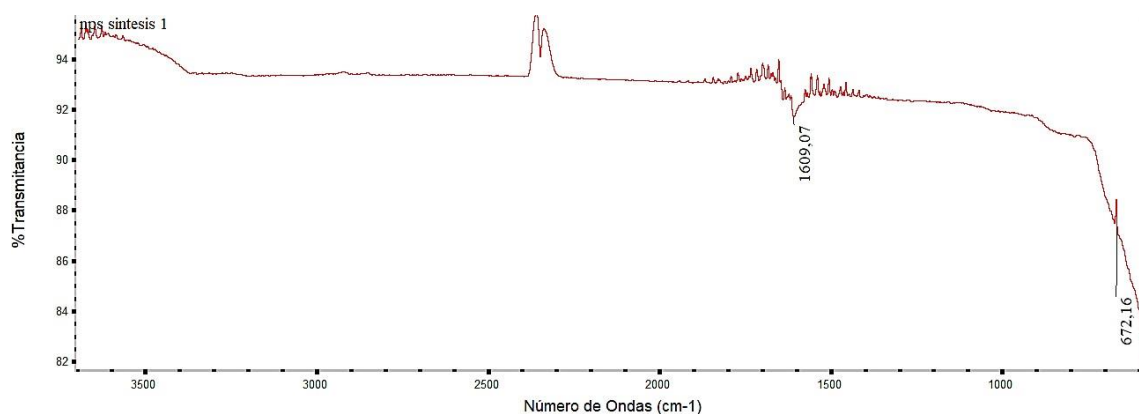


Ilustración 18. Espectro IR de la muestra de nanopartículas JMS1

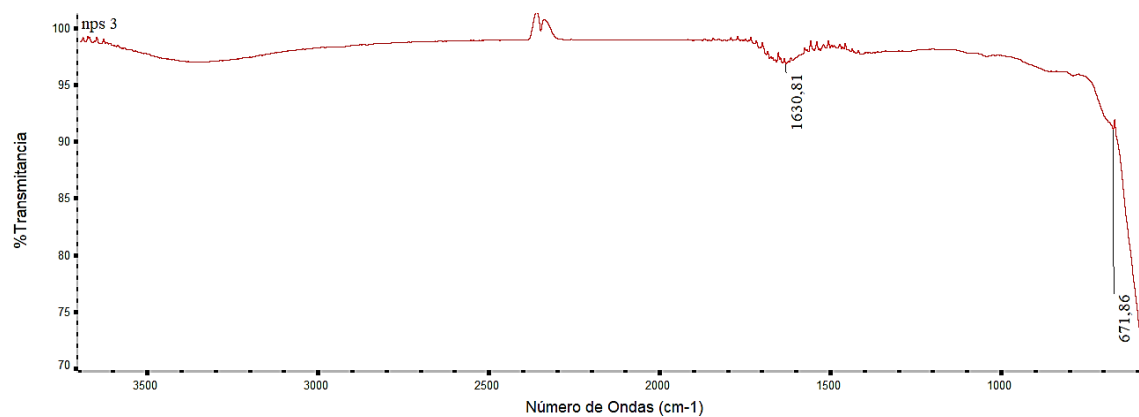


Ilustración 19. Espectro IR de la muestra de nanopartículas JMS3

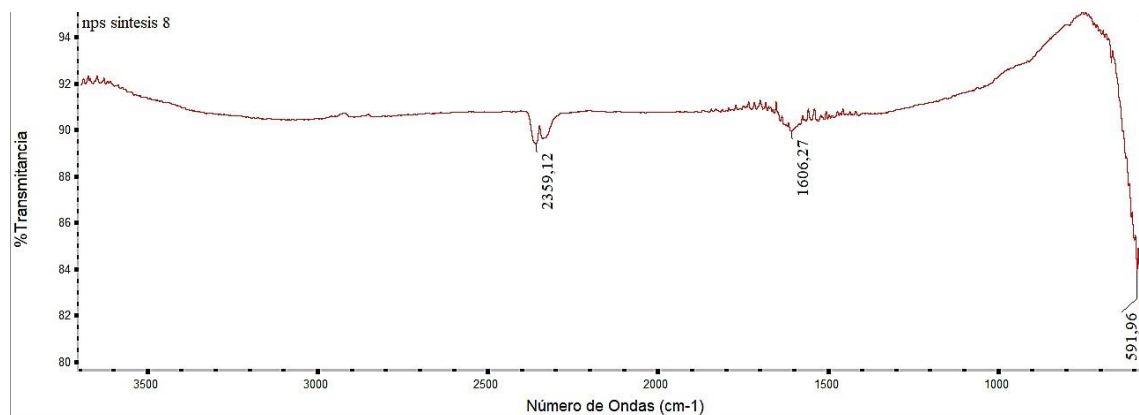


Ilustración 20. Espectro IR de la muestra de nanopartículas JMS8



De la misma forma se sometió a los sobrenadantes de las síntesis de nanopartículas a IRTF (ilustraciones 21, 22 y 23) y se pudo apreciar que las señales mayoristas que aparecen son los picos característicos del etanol, el cual fue utilizado en las síntesis (Jadhav et al., 2017).

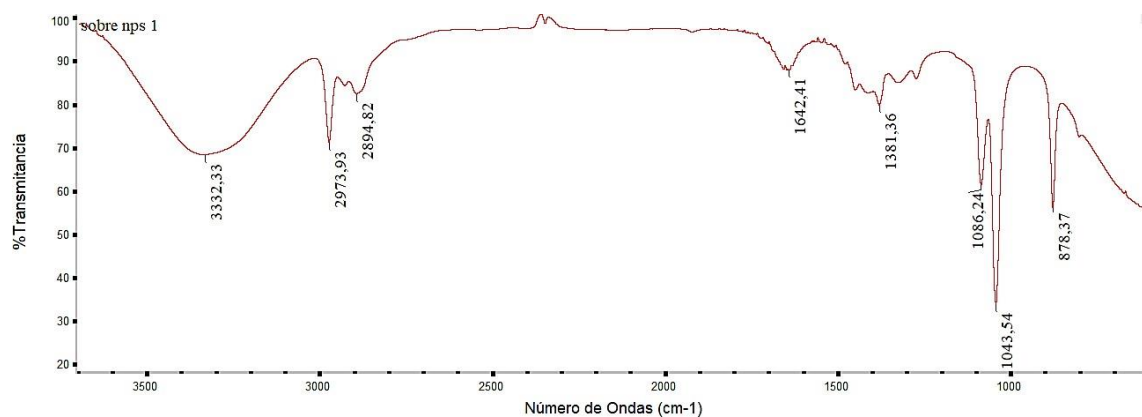


Ilustración 21. Espectro IR del sobrenadante de la síntesis JMS1

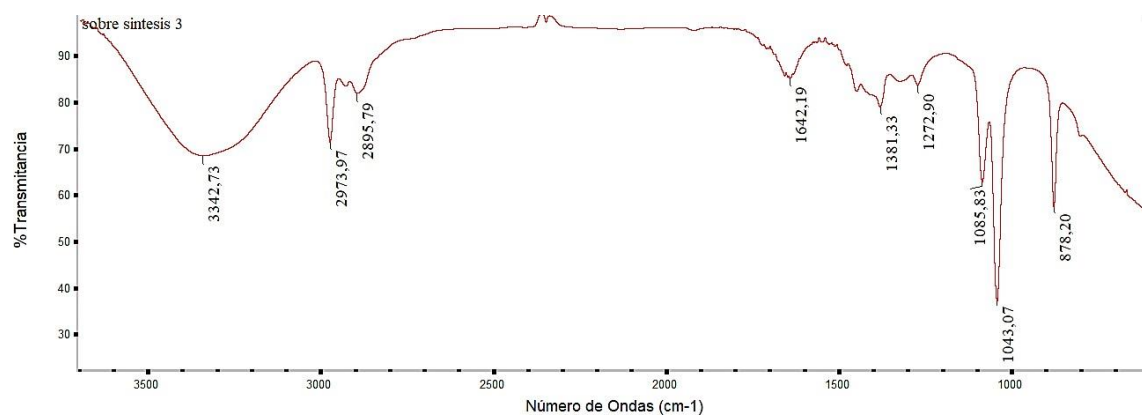


Ilustración 22. Espectro IR del sobrenadante de la síntesis JMS3

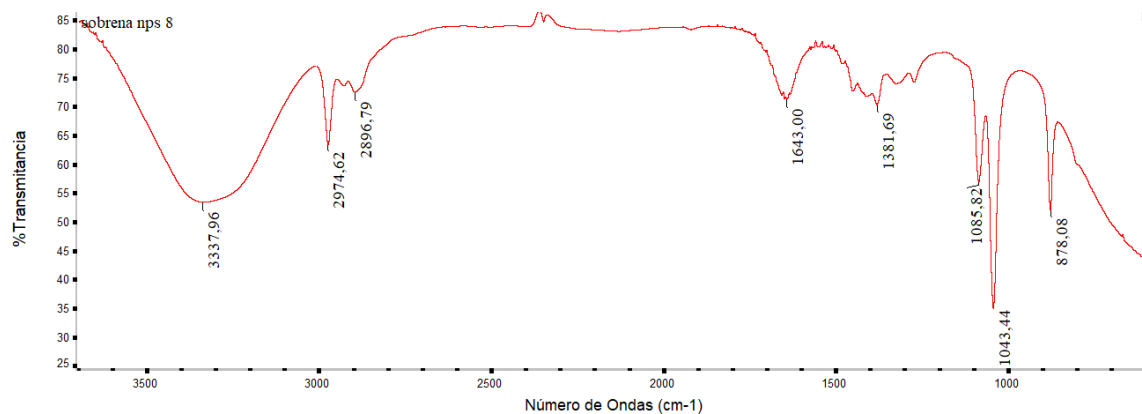


Ilustración 23. Espectro IR del sobrenadante de la síntesis JMS8



Ensayo de sedimentación

Se evaluó el tiempo en que tardan en sedimentar las nanopartículas en agua destilada, y se cuantificó su absorbancia por UV-Vis en el valor máximo de absorción (tabla 6). Con los valores de absorbancia obtenidos, se cuantifico la concentración para cada tipo de nanopartículas (tabla 7).

Tiempo (h)	Abs JMS1 (264 nm)	Abs JMS3 (892 nm)	Abs JMS5 (857 nm)	Abs JMS7 (664 nm)	Abs JMS8 (880 nm)
0	0,437	0,798	0,821	0,478	0,579
0,5	0,411	0,89	0,886	0,428	0,772
1,5	0,382	0,871	0,911	0,457	0,657
3	0,342	0,859	0,908	0,245	0,572
4	0,17	0,699	0,875	0,119	0,404
5,45	0,207	0,643	0,829	0,097	0,271

Tabla 6. Datos de absorbancia de los ensayos de sedimentación en agua destilada

Tiempo (h)	[] ppm JMS8	[] ppm JMS5	[] ppm JMS1	[] ppm JMS3	[] ppm JMS7
0	101,74	95,59	100,29	97,71	102,00
0,5	137,48	103,71	92,86	109,35	91,13
1,5	116,19	106,84	84,57	106,95	97,43
3	100,44	106,46	73,14	105,43	51,35
4	69,33	102,34	24,00	85,18	23,96
5,45	44,70	96,59	34,57	78,09	19,17

Tabla 7. Datos de concentración del ensayo de sedimentación

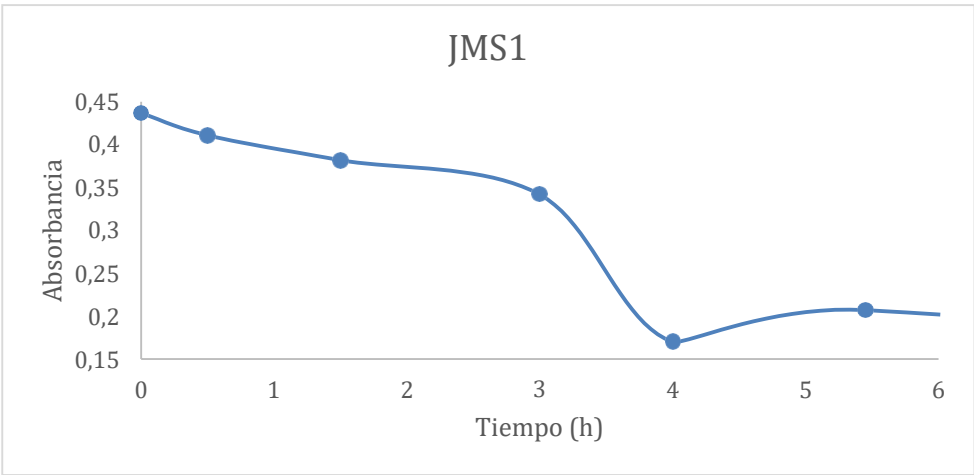


Ilustración 24. Curva de sedimentación Nps JMS1

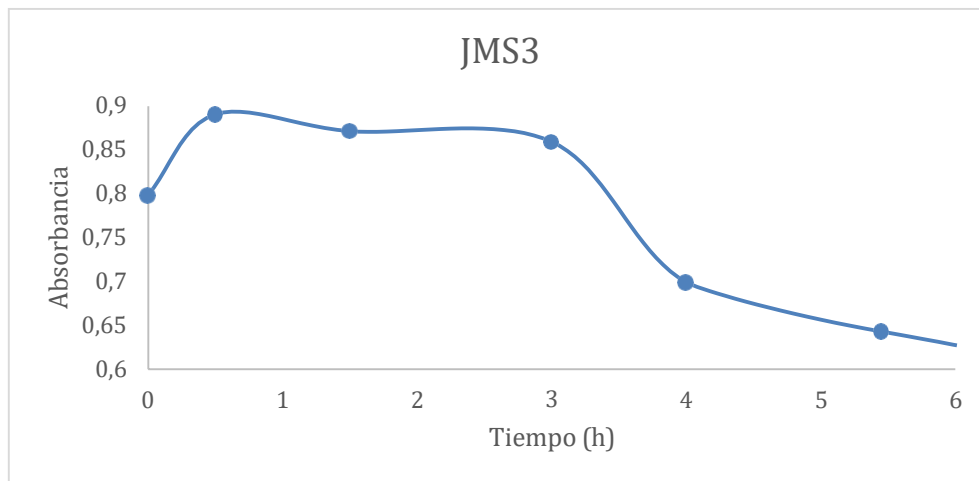


Ilustración 25. Curva de sedimentación Nps JMS3

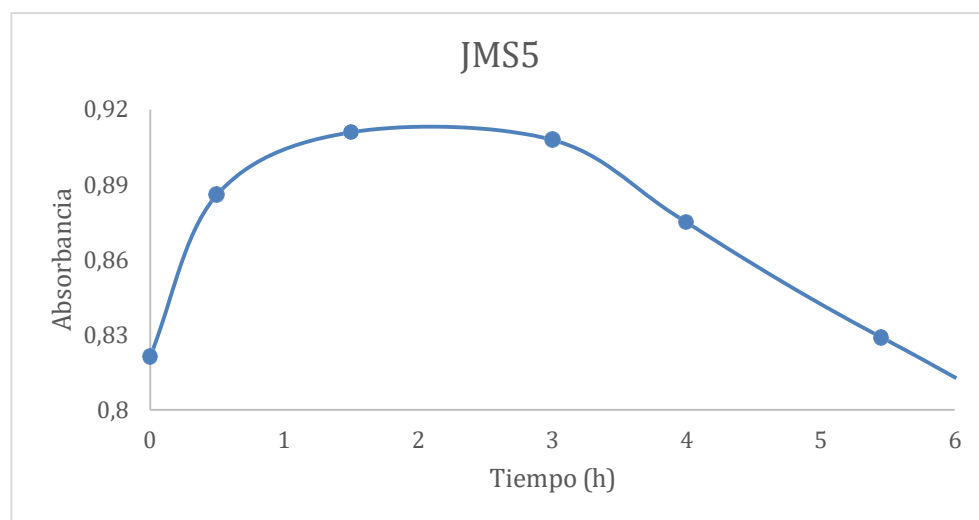


Ilustración 26. Curva de sedimentación Nps JMS5

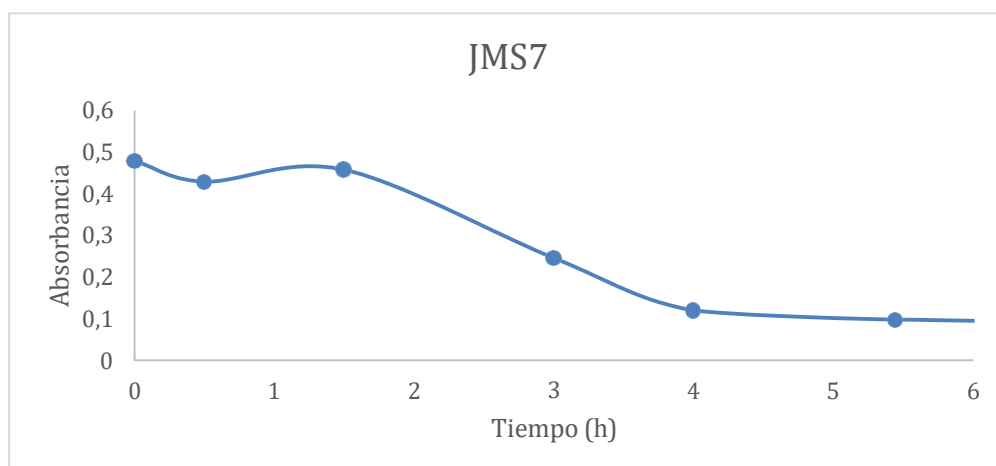


Ilustración 27. Curva de sedimentación Nps JMS7

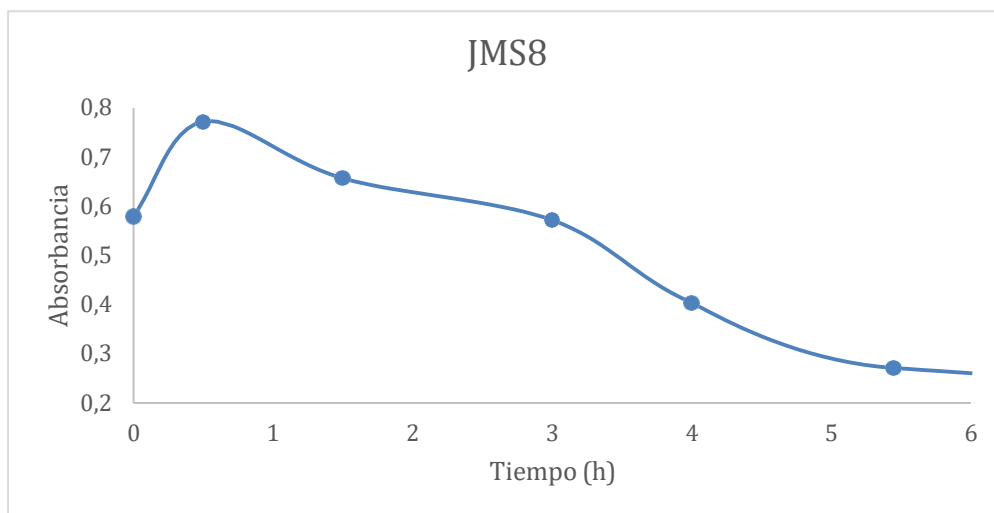


Ilustración 28. Curva de sedimentación Nps JMS8

En todos los análisis de UV-Vis, ilustración 24, 25, 26, 27, 28, se aprecia un pico de absorbancia en un rango de tiempo que varía entre la primera y sexta hora. Además, se establece la influencia de las condiciones de reacción con la velocidad de sedimentación, tal es así, que a mayor tiempo de reacción (24h) y menor temperatura (160°C) de síntesis, las nanopartículas tienden a sedimentar de manera más rápida, y por lo tanto mayor es el tamaño de partícula.

Para justificar el fenómeno de absorción en nanopartículas metálicas, se han sugerido muchas explicaciones como: efectos cuánticos de tamaño, amplia distribución de tamaños de partículas, absorción de revestimiento de las partículas, transiciones electrónicas dentro de la red cristalina (Cárdenas Triviño & Cruzat Contreras, 2018) (Vikesland et al., 2016). Otra explicación asociada a este fenómeno es la resonancia del plasmón el cual, debido a la naturaleza de los metales, los átomos son considerados como puntos masivos fijos con carga positiva neta alrededor de un mar de electrones y estos interactúan con la radiación electromagnética (González et al., 2012)

Ensayo de estabilidad

Se determinó la estabilidad de las matrices poliméricas por observación directa (ilustración 29), en donde se analizó la degradación que sufre con respecto a la susceptibilidad en medio ácido (pH 1). La matriz polimérica CS a tiempo 0 del ensayo, desapareció casi por completo, solamente se observan unas delgadas fibras alargadas. Por otro lado, la solución ácida no tuvo efecto alguno sobre la matriz polimérica CS/Nps, en la cual, se apreciaba un film flotando en la solución. Para la matriz polimérica CS/EEP se presentó un ligero hinchamiento en su estructura



manteniéndose en este estado y en el caso de la matriz polimérica CS/EEP/Nps se observó una disgregación del film en fibras alargadas las cuales presentan un gran hinchamiento



Ilustración 29. Ensayo de estabilidad, matrices poliméricas en agua ácida

Análisis DRX

Con el difractograma de la muestra JMS1, se obtienen resultados que indican atributos cristalográficos a causa de la existencia de picos, que advierten la presencia de planos de difracción. Estos se lograron identificar en la muestra, y como consecuencia se determinó el parámetro de celda de cada uno de los planos (Tabla 8). Los parámetros de celda calculados fueron semejantes a los de los cristales de ZnO, (a y $b = 3,25$ y $c = 5,2$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$), Fe_3O_4 (a , b y $c = 8,39$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) y ZnFe_2O_4 (a , b y $c = 8,45$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) (Downs, 2018), demostrando de esta manera que con la síntesis realizada se formaron estructuras cristalinas de tipo espinelas. En la ilustración 30 se presentan los planos y parámetros de red calculados, así como las estructuras a la que le pertenece cada plano.

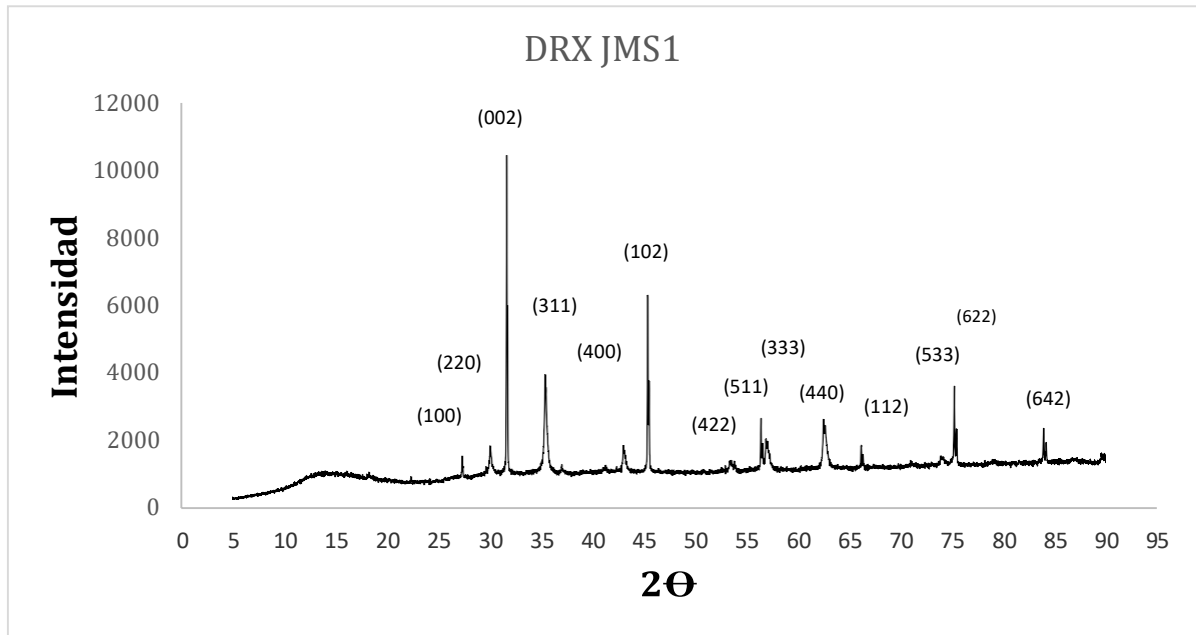


Ilustración 30. Análisis DRX de la muestra JMS1

Para la obtención de los resultados que se muestran en la tabla 8 se utilizó la ley de Bragg y la ecuación de distancia interplanar para estructuras cúbicas. Se utilizó la ecuación 4 porque esta coincidió con los valores de los parámetros de red de bibliografía.

$$n\lambda = 2d\sin(\theta)$$

Ecuación 3. Ley de Bragg

$$\frac{1}{d^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2}$$

Ecuación 4. Fórmula de distancia interplanar para un cristal cúbico

Pico	2θ	θ	sin(θ)	Distancia interplanar (d) (Å)	Parámetro de red (Å)	Plano	Cristal
1	27	13,5	0,233	3,3	3,3	(100)	ZnO
2	30	15	0,259	2,98	8,5	(220)	Fe ₃ O ₄
3	32	16	0,276	2,79	5,5	(002)	ZnO
4	35,5	17,75	0,305	2,53	8,4	(311)	Fe ₃ O ₄
5	43	21,5	0,367	2,1	8,4	(400)	ZnFe ₂ O ₄
6	45,5	22,75	0,387	1,99	4,5	(102)	ZnO
7	53,5	26,75	0,450	1,71	8,4	(422)	Fe ₃ O ₄
8	56	28	0,469	1,64	8,5	(511)	ZnFe ₂ O ₄
9	57	28,5	0,477	1,61	8,4	(333)	Fe ₃ O ₄
10	63	31,5	0,522	1,47	8,3	(440)	Fe ₃ O ₄
11	66	33	0,545	1,41	3,5	(112)	ZnO
12	75	37,5	0,609	1,26	8,3	(533)	Fe ₃ O ₄
13	75,5	37,75	0,612	1,26	8,3	(622)	Fe ₃ O ₄
14	84,5	42,25	0,672	1,15	8,6	(642)	ZnFe ₂ O ₄

Tabla 8. Identificación de los planos del difractograma de rayos X



Análisis MEB

Las muestras analizadas por MEB fueron las fibras de CS, CS/EEP, CS/Nps y CS/EEP/Nps. Los resultados obtenidos, ilustración 31, 32, 33, 34, muestran que las fibras presentan superficies lisas y homogénea ya que no se puede distinguir alguna fase dispersa en las imágenes MEB (Matei et al., 2015). De igual manera se observa que la estructura formada tiende a ser un nanofilm, en virtud de que las fibras se pudieron ir compactando debido a la alta temperatura generada por el arco eléctrico del equipo.

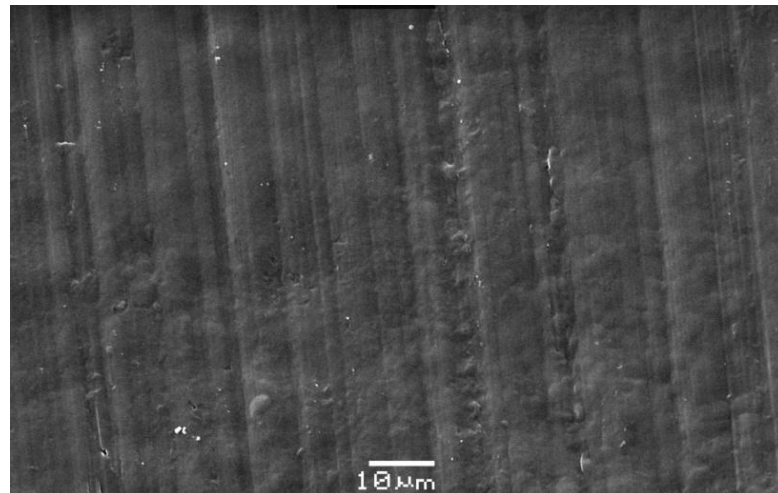


Ilustración 31. Análisis MEB de la fibra de CS

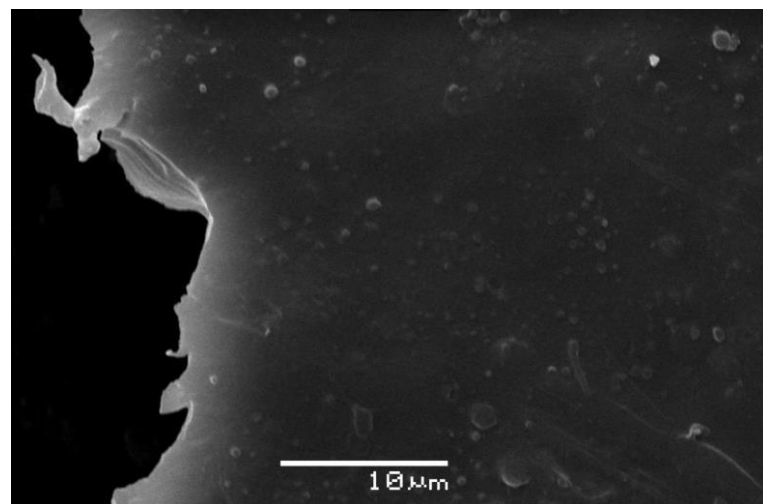


Ilustración 32. Análisis MEB de la fibra de CS/Nps

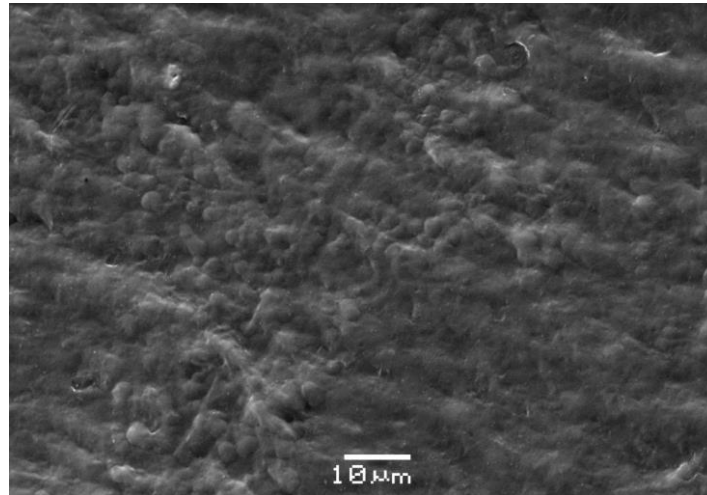


Ilustración 33. Análisis MEB de la fibra de CS/EEP

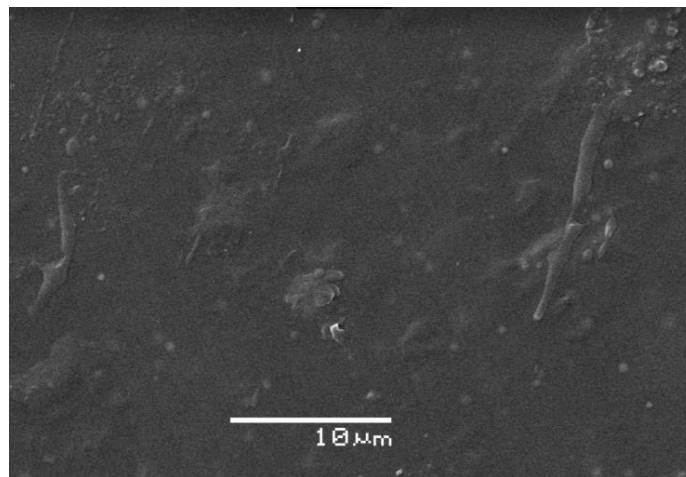


Ilustración 34. Análisis MEB de la fibra CS/EEP/Nps

Análisis MET

Se realizó la microscopía de transmisión a la síntesis JMS1, y la muestra JMS3 misma que fue utilizada en todos los ensayos de liberación. En la imagen de la síntesis JMS3 (ilustración 35) se aprecia un aglomeramiento de las nanopartículas lo cual hace difícil la determinación del tamaño de partícula, así como la observación de la estructura cristalina (Rivero García, 2018). Por esta razón no se realizó el análisis del tamaño de partícula.

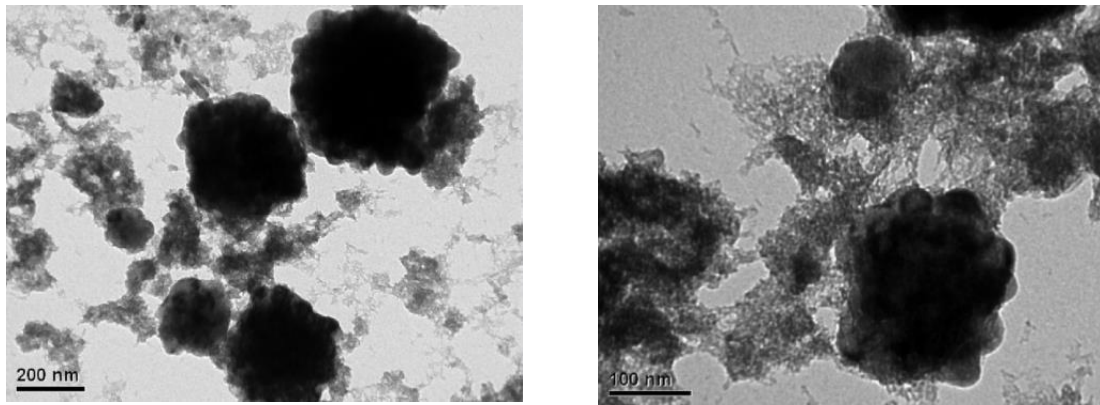


Ilustración 35. MET de Nps de la muestra JMS3

La muestra JMS1 (ilustración 36) presenta una composición heterogénea en la cual se distinguen dos tipos de estructuras cristalinas, una semi-hexagonal, atribuida al cristal de ZnO y al ZnFe_2O_4 y otra en forma de agujas, asignada al Fe_3O_4 . (Yu et al., 2018) (Aquino et al., 2018). Las nanopartículas presentaban ferromagnetismo, fenómeno que se atribuye a las agujas de la espinela de hierro (Cortés Barrena, 2018). Por otro lado, a pesar de haber 3 tipos de nanopartículas, la muestra al someterse a un campo magnético no presentaba separación de partículas, lo que indica la existencia de algún tipo de interacción entre las tres estructuras presentes (Jayakumar et al., 2006).

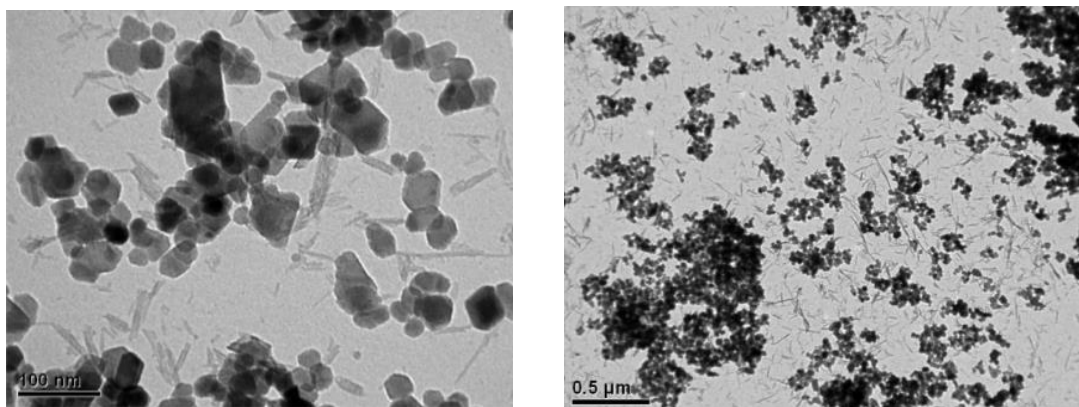


Ilustración 36. MET de Nps de la muestra JMS1

Se determinó el tamaño de partícula promedio por medio del software ImageJ. Se presentaron dos tipos de distribuciones de tamaños siendo estas $24,66 \pm 4,68$ nm y $47,31 \pm 7,48$ nm. Estas representan el 78,43% y 21,46% respectivamente. La tabla 9 muestra los diámetros de partículas (D_p) y la ilustración 37 y 38 la distribución normal del tamaño de partículas.



Muestra	Dp	Muestra	Dp	Muestra	Dp
1	54,76	18	22,07	35	18,95
2	26,12	19	20,3	36	28,6
3	48,49	20	22,26	37	17,8
4	48,35	21	19,89	38	19,9
5	37,86	22	25,36	39	31,9
6	30,35	23	17,1	40	50,87
7	22,4	24	32,54	41	28,63
8	18,66	25	21,46	42	21,77
9	18,41	26	31,18	43	27,46
10	64,53	27	27,46	44	26,61
11	23,45	28	23,63	45	19,31
12	16,14	29	27,41	46	41,2
13	18,81	30	30,25	47	27,27
14	41,07	31	25,14	48	36,43
15	44,2	32	25,06	49	26,58
16	43,45	33	27,92	50	30,21
17	45,64	34	30,71	51	29,85

Tabla 9. Datos de los diámetros de partículas obtenidos por el software Image J

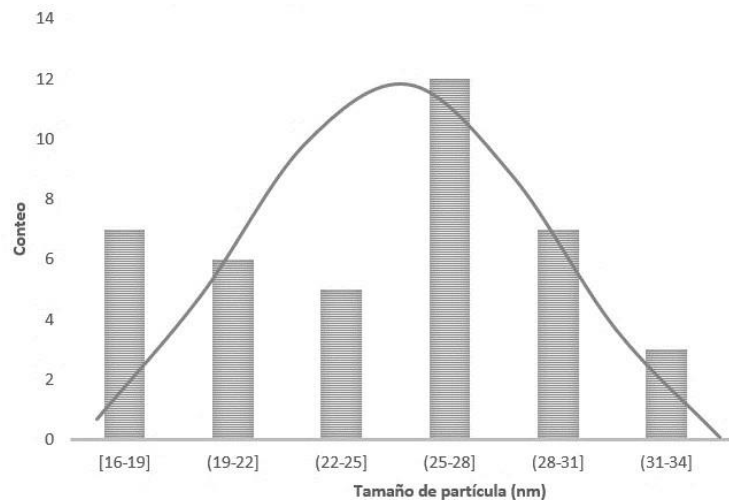


Ilustración 37. Distribución normal del tamaño de partícula entre 16 y 34 nm.

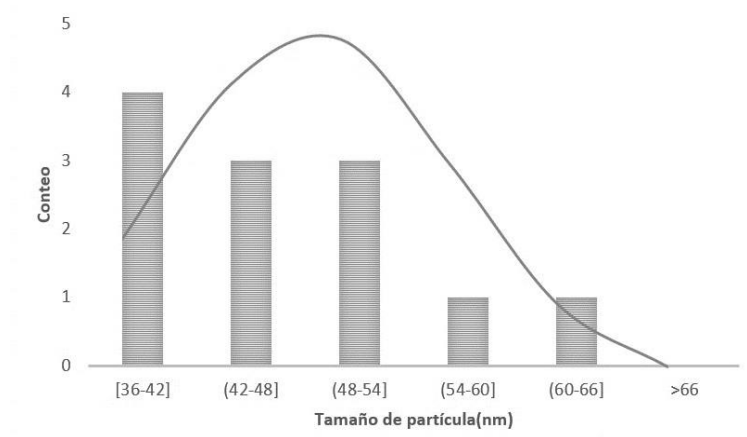


Ilustración 38. Distribución normal del tamaño de partícula entre 34 y 66 nm.

Microscopía de campo oscuro

Con una difracción de electrones de área seleccionada obtuvimos una micrografía de campo oscuro de la muestra JMS1 como se muestra en la ilustración 39. Con este haz difractado se determina la presencia de diferentes estructuras cristalográficas (Castro Barriga, 2014), en este caso siendo los cristales de mayor incidencia el ZnO y con una lectura más tenue las agujas correspondientes al Fe_3O_4 . Demostrando de esta manera la presencia de cristales en la muestra.

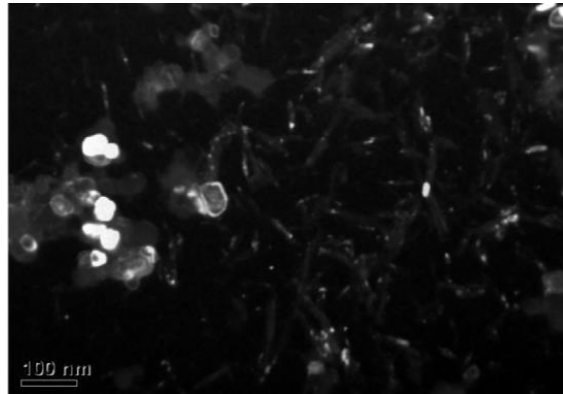


Ilustración 39. Campo oscuro de Nps muestra JMS1

SAED (Selected Area electron Diffraction)

Con el análisis *SAED* se visualiza la formación de anillos por la difracción de los planos cristalográficos que presenta la muestra JMS1, por lo que se deduce la naturaleza cristalina de la misma. Para la identificación de los planos cristalográficos se utilizó la ecuación 5. Los planos a destacar son los marcados en la ilustración 40, siendo el (100) y (112) característicos de la molécula de ZnO (Xu et al., 2020) (K. Wu et al., 2020), mientras que los otros planos, (311), (400), (440) (642) son característicos del cristal de Fe_3O_4 y ZnFe_2O_4 (Fang et al., 2018) (Surendra et al., 2020) (Huang et al., 2020).

$$\frac{R_1}{R_2} = \frac{\sqrt{h_1^2 + k_1^2 + l_1^2}}{\sqrt{h_2^2 + k_2^2 + l_2^2}}$$

Ecuación 5. Ecuación desarrollada de la ley de Bragg

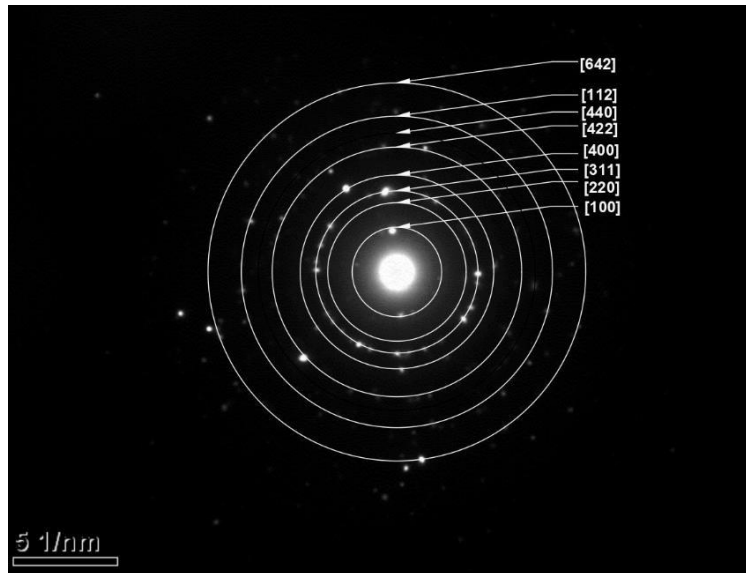


Ilustración 40. Patrón de difracción SAED

Ensayos de liberación

Curva de calibración del propóleo (etanol)

Con un barrido espectral de soluciones patrón (5, 10, 20, 50, 75, 100 ppm) de propóleo se determinó la longitud de onda del máximo de absorción del mismo en etanol, obteniendo un valor de 293 nm como se identifica en la ilustración 70.

A partir de estos datos se construyó una curva de calibración (ilustración 41), donde se puede observar una buena correlación lineal, con un valor de $R^2 = 0,9967$.

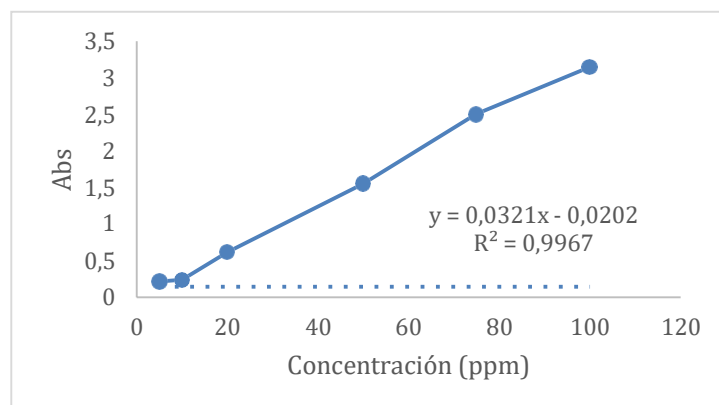


Ilustración 41. Curva de calibración del propóleo



Curva de calibración nanopartículas (etanol)

De la misma manera con un barrido espectral de soluciones patrón (1, 2, 4, 5, 6, 10, 20, 50, 100 ppm) de nanopartículas (JMS3) se determinó la longitud de onda de absorbancia de las mismas, obteniendo un valor de 775 nm (ilustración 69). A partir de estos datos se construyó una curva de calibración (ilustración 42), donde se puede observar una buena correlación lineal, con un valor de $R^2 = 0,9983$. Cabe resaltar, que se utilizaron las nanopartículas JMS3, debido a que, estas fueron las que se utilizaron en la elaboración de las matrices poliméricas.

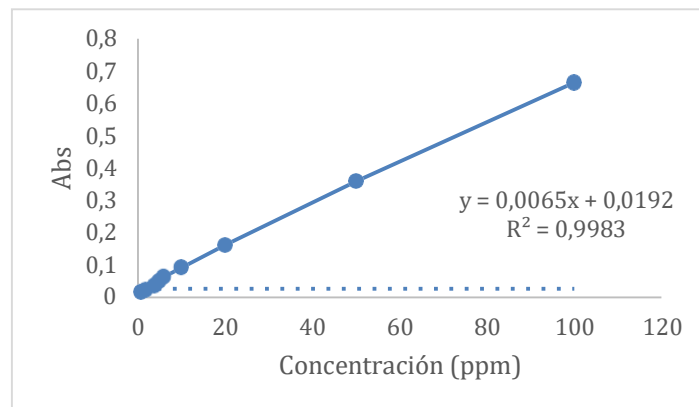


Ilustración 42. Curva de calibración para las nanopartículas en etanol al 70%

Liberación del Propóleo (T= 40 °C)

Matriz polimérica CS/EEP

Tiempo (min)	Abs	[]EEP (ppm)	Masa (mg)	Fracción liberada (EEP) ($m_{total}/m_{liberado}$)	\sqrt{t} (min ^{1/2})
2	1,613	50,879	2,544	0,424	1,414
5	2,214	69,601	3,424	0,571	2,236
10	2,219	69,757	3,431	0,572	3,162
15	2,243	70,505	3,461	0,577	3,873
30	2,325	73,059	3,558	0,593	5,477
60	2,532	79,508	3,784	0,631	7,746
120	2,827	88,698	4,078	0,680	10,954
180	3,252	101,938	4,462	0,744	13,416
240	3,733	116,922	4,852	0,809	15,492
300	3,903	122,218	4,974	0,829	17,321
360	4,282	134,025	5,210	0,868	18,974

Tabla 10. Datos ensayos de liberación a 40 °C para la matriz polimérica CS/EEP

Según los datos obtenidos en la tabla 10 se identifica una tendencia de liberación controlada, y al analizar los valores de masa liberada se obtiene que a los minutos 2 y 5 minutos existe una rápida salida del propóleo (57.1%), y a medida que transcurre el tiempo, la velocidad de liberación del propóleo va disminuyendo, hasta llegar a una masa



del 86.8% a las 6 h, tal como indica Viñanzaca (Viñanzaca, 2019).

Se realizó el ajuste de los datos obtenidos a los modelos matemáticos planteados obteniendo los siguientes resultados:

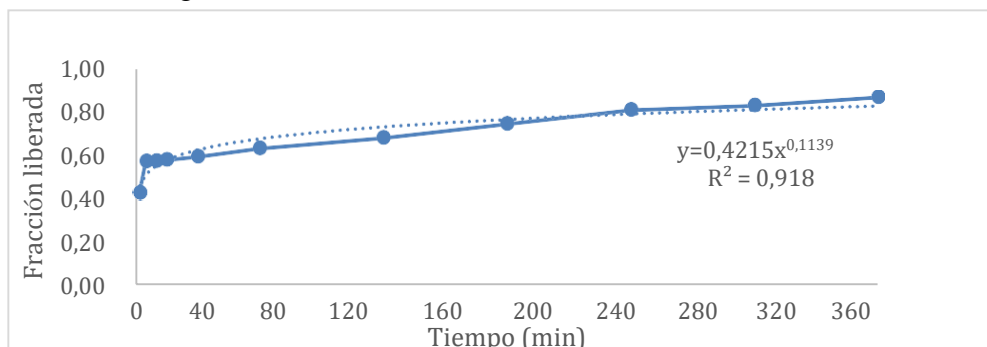


Ilustración 43. Liberación del Propóleo 40 °C (Korsmeyer-Peppas) para la matriz polimérica CS/EEP

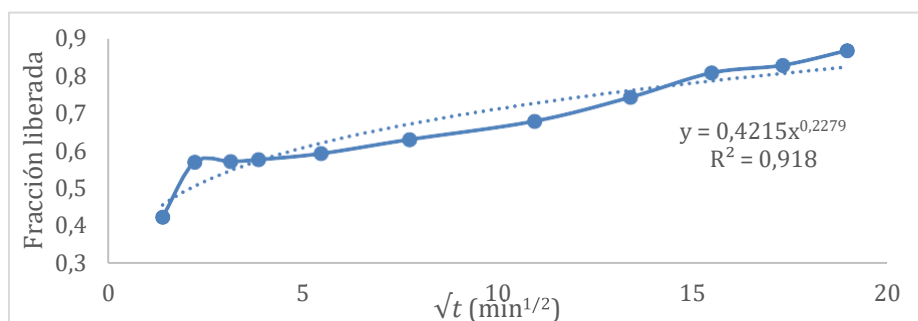


Ilustración 44. Liberación del propóleo a 40°C (Higuchi)

En las ilustraciones 43 y 44 se realizó el modelado para identificar el mecanismo de liberación del propóleo, se ajustó los datos al modelo matemático de Korsmeyer-Peppas y al de Higuchi. Se utilizaron estos modelos porque describen la liberación de sustancias en matrices tipo films, además de definir muchos tipos de mecanismos.

Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
n	R ²	n	R ²
0,2279	0,918	0,1139	0,9180

Tabla 11. Parámetros de los modelos matemáticos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas para los ensayos de liberación a 40 °C de la matriz polimérica CS/EEP

Como se analiza en la tabla 12, ambos modelos tienen el mismo índice de correlación, por lo que para determinar el mecanismo de liberación se toma en cuenta el exponente. Para Higuchi el n debe tener un valor aproximado de 0.5 mientras que para Korsmeyer y Peppas no hay ninguna restricción, por lo que éste último describiría la forma de liberación. El modelo de Korsmeyer y Peppas indica que estamos en presencia de una difusión no Fickiana, donde se produce la difusión del compuesto a través de la matriz hinchada y por los poros (tabla 2) (López Gasco, 2011).



Liberación nanopartículas (T= 40 °C)

Matriz polimérica CS/Nps

Tiempo (min)	Abs	[η] _{Nps} (ppm)
2	-0,002	-3,261
5	-0,001	-2,953
10	-0,001	-2,953
15	-0,001	-2,953
30	-0,001	-2,953
60	-0,001	-2,953
120	-0,002	-3,261
180	-0,003	-3,415
240	-0,001	-2,953
300	-0,001	-2,953
360	-0,004	-2,338

Tabla 12. Parámetros de los ensayos de liberación a 40 °C para la matriz polimérica de CS/Nps

Como se observa en la tabla 13, para el caso de las nanopartículas en la matriz polimérica de CS/Nps las lecturas del UV-Vis no muestran valores de absorbancia positivos por lo que se estima que no existe liberación alguna.

Este fenómeno se debe a que las nanopartículas se encuentran encapsuladas dentro de la matriz polimérica y no se liberan porque la fibra no sufre ningún tipo de degradación física.

Liberación del Propóleo y nanopartículas (T= 40 °C)

Matriz polimérica CS/EEP/Nps

Tiempo (min)	Abs (EEP)	Abs (Nps)	[η] _{EEP} (ppm)	[η] _{Nps} (ppm)	Masa (EEP) (mg)	Fracción liberada (EEP) ($m_{total}/m_{liberado}$)	\sqrt{t} (min ^{1/2})
2	2,098	-0,004	65,988	-3,569	3,299	0,550	1,414
5	2,116		66,548	-2,954	3,326	0,554	2,236
10	2,132		67,047	-2,954	3,348	0,558	3,162
15	2,137		67,202	-2,954	3,354	0,559	3,873
30	2,212		69,539	-2,954	3,443	0,574	5,477
60	2,314		72,717	-2,954	3,554	0,592	7,746
120	2,406	-0,005	75,583	-3,723	3,646	0,608	10,954
180	2,606		81,813	-2,954	3,826	0,638	13,416
240	2,796		87,732	-2,954	3,980	0,663	15,492
300	2,867		89,944	-2,954	4,031	0,672	17,321
360	2,927	-0,004	91,813	-3,569	4,069	0,678	18,974

Tabla 13. Datos de los ensayos de liberación a 40 °C de la matriz polimérica de CS/EEP/Nps



Como se presenta en la tabla 14, de la misma manera que en el caso de la matriz polimérica de CS/Nps no existe liberación de las nanopartículas en el medio.

En el caso del propóleo si se da una liberación siendo esta semejante a la de la matriz polimérica de CS/EEP. Es decir, al inicio del proceso existe una rápida liberación de propóleo, y mientras pasa el tiempo esta se vuelve cada vez más lenta.

Para los modelos matemáticos se obtuvieron los siguientes resultados:

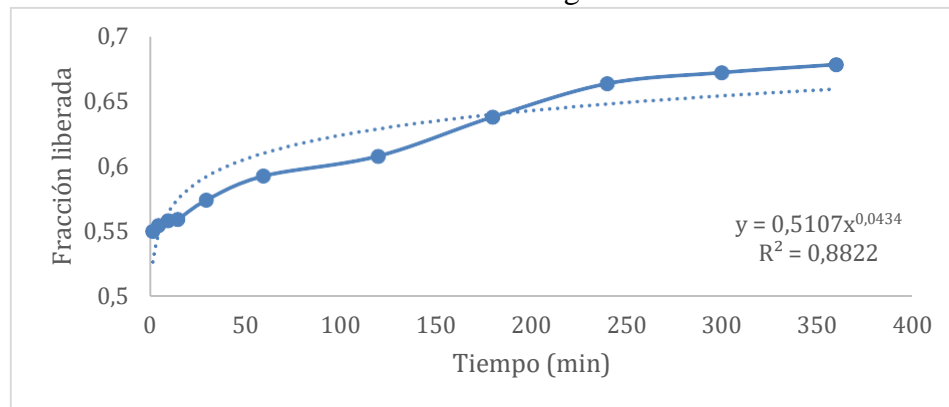


Ilustración 45. Liberación del Propóleo a 40 °C (Korsmeyer-Peppas) de la matriz polimérica CS/EEP/Nps

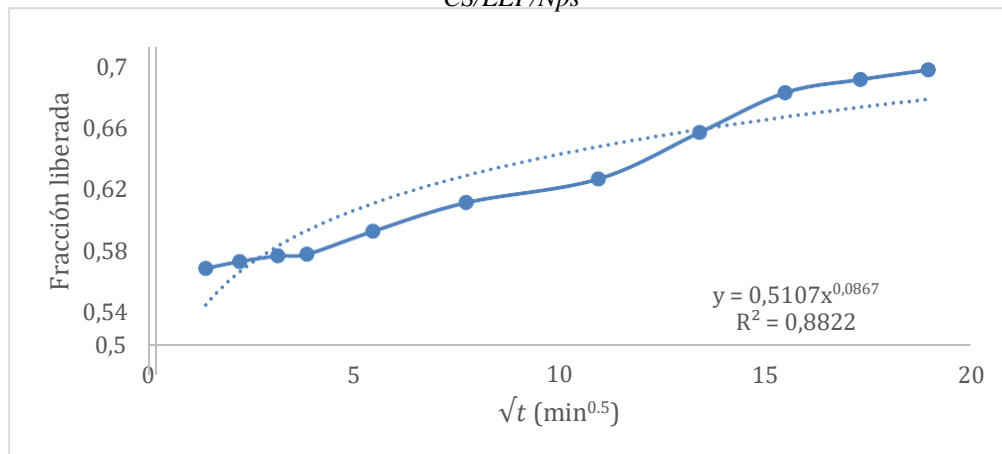


Ilustración 46. Liberación de propóleo a 40°C (Higuchi) para la matriz polimérica CS/EEP/Nps

Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
n	R ²	n	R ²
0,0867	0,8881	0,0434	0,8822

Tabla 14. Parámetros de los modelos matemáticos de Higuchi y Kosmeyer-Peppas para los ensayos de liberación a 40 °C de la matriz polimérica CS/EEP/Nps.

Para este caso se contempla que la liberación se ajusta más al modelo de Korsmeyer y Peppas (ilustración 45 y 46) a causa al valor de n (0,0434) (tabla 15) ya que indica que existe un mecanismo de liberación no Fickiano y que se libera por medio del hinchamiento y difusión por los poros de la matriz polimérica. (López Gasco, 2011).



Liberación del Propóleo (T= 30 °C)

Matriz polimérica CS/EEP

Tiempo (min)	Abs	[] _{EEP} (ppm)	Masa (EEP) (mg)	Fracción liberada (EEP) ($m_{total}/m_{liberado}$)	\sqrt{t} (min ^{0,5})
2	2,412	75,769	3,788	0,631	1,414
5	2,426	76,206	3,809	0,635	2,236
10	2,448	76,891	3,839	0,640	3,162
15	2,478	77,826	3,877	0,646	3,873
30	2,708	84,991	4,150	0,692	5,477
60	2,741	86,019	4,186	0,698	7,746
120	2,870	90,037	4,314	0,719	10,954
180	3,185	99,850	4,599	0,766	13,416
240	3,507	109,882	4,860	0,810	15,492
300	3,561	111,564	4,898	0,816	17,321
360	3,618	113,340	4,934	0,822	18,974

Tabla 15. Datos de los ensayos de liberación a 30 °C de la matriz polimérica de CS/EEP

En la tabla 16 se identifica que la masa final del propóleo liberado a 30°C (4.93 mg) disminuye en comparación con la que se obtuvo en el ensayo a 40 °C (5.2 mg) (tabla 11), pudiendo demostrar que, al aumentar la temperatura en la matriz polimérica CS/EEP se libera más propóleo. Asimismo, existe una liberación súbita del propóleo y a medida que transcurre el tiempo, ésta va siendo más lenta.

Para los modelos matemáticos se obtuvieron los siguientes resultados:

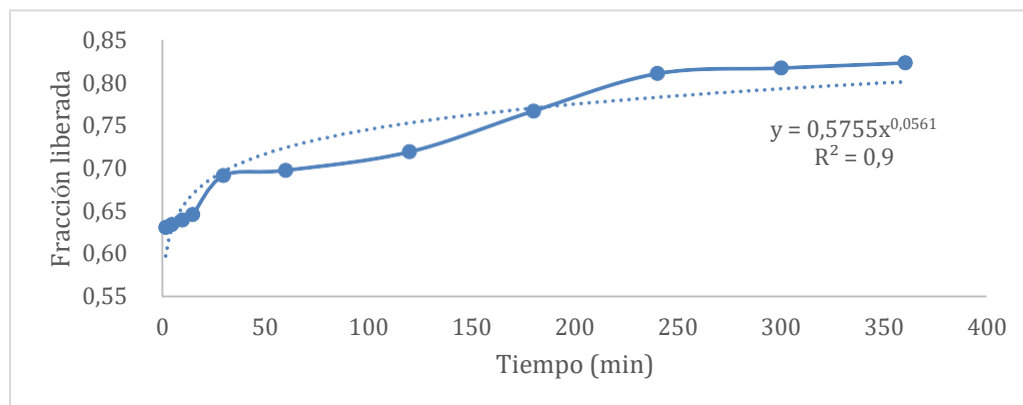


Ilustración 47. Liberación del Propóleo a 30 °C (Korsmeyer-Peppas) para la matriz polimérica CS/EEP

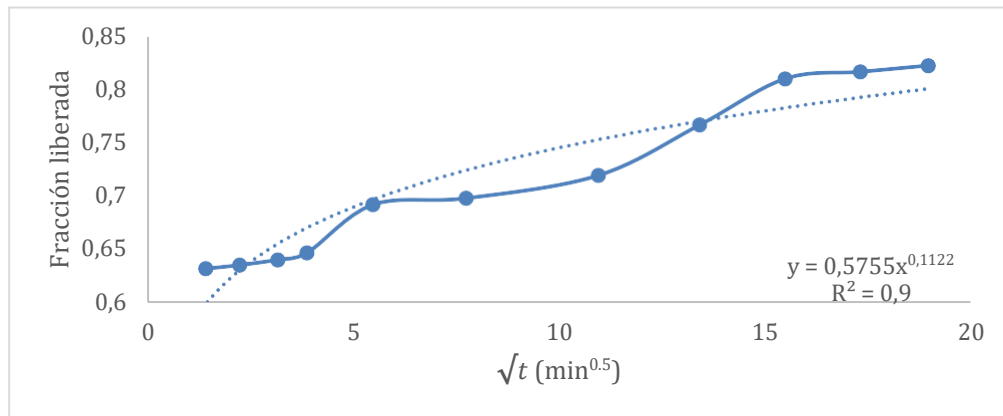


Ilustración 48. Liberación del propóleo a 30°C (Higuchi) para la matriz polimérica CS/EEP

Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
n	R ²	n	R ²
0,1122	0,9	0,0561	0,900

Tabla 16. Parámetros de los modelos matemáticos de Higuchi y Kosmeyer-Peppas para los ensayos de liberación a 30 °C de la matriz polimérica CS/EEP

En las ilustraciones 47 y 48 se representan los ajustes de los datos para los modelos de liberación planteados.

De igual manera que en los casos anteriores (matriz polimérica de CS/EEP y CS/EEP/Nps a 40°C), el modelo de Korsmeyer y Peppas es el que mejor se adapta para la matriz polimérica de CS/EEP a 30°C por el valor de n y con un índice de correlación de R= 0,9 (tabla 17), el cual describe un mecanismo de liberación no Fickiano y una liberación por hinchamiento de la matriz y por la difusión a través de los poros (López Gasco, 2011).

Liberación nanopartículas (T= 30 °C)

Matriz polimérica CS/Nps

Tiempo (min)	Abs	[] _{Nps} (ppm)
2	-0,004	-3,569
5	-0,002	-2,954
10	-0,002	-2,954
15	-0,002	-2,954
30	0,002	-2,954
60	-0,003	-3,415
120	-0,002	-2,954
180	-0,002	-2,954
240	-0,001	-2,8
300	-0,002	-2,954
360	-0,004	-3,569

Tabla 17. Datos ensayo de liberación a 30 °C de la matriz polimérica CS/Nps



Como se indica en la tabla 18, para el caso de las nanopartículas en la matriz polimérica de CS/Nps las lecturas del UV-Vis no dan valores positivos de absorbancia, por lo que no existe liberación alguna.

Liberación del Propóleo y nanopartículas (T= 30 °C)

Matriz polimérica CS/EEP/Nps

Tiempo (min)	Abs (EEP)	Abs (Nps)	[] _{EEP} (ppm)	[] _{Nps} (ppm)	Masa (EEP) (mg)	Fracción liberada (EEP) ($m_{total}/m_{liberado}$)	\sqrt{t} ($min^{0,5}$)
2	1,616	-0,003	50,972	-3,415	2,549	0,425	1,414
5	1,704		53,713	-2,954	2,677	0,446	2,236
10	1,756		55,333	-2,954	2,749	0,458	3,162
15	1,788	-0,004	56,330	-3,569	2,790	0,465	3,873
30	1,845	-0,002	58,106	-3,262	2,857	0,476	5,477
60	2,084		65,551	-2,954	3,118	0,520	7,746
120	2,133		67,078	-2,954	3,167	0,528	10,954
180	2,348		73,776	-2,954	3,361	0,560	13,416
240	2,632	-0,003	82,623	-3,415	3,591	0,598	15,492
300	2,878		90,287	-2,954	3,767	0,628	17,321
360	2,899	-0,004	90,941	-3,569	3,780	0,630	18,974

Tabla 18. Datos de los ensayos de liberación a 30 °C de la matriz polimérica de CS/EEP/Nps

Al igual que en la tabla 18, se puede examinar que la masa final del propóleo liberado en la matriz polimérica de CS/EEP/Nps a 30°C (3.7 mg) (tabla 19) disminuye en comparación con la que se obtuvo en el ensayo a 40 °C (4.07 mg) (tabla 14), por lo que, de esta manera, se demuestra que, al aumentar la temperatura en se libera más propóleo. Sin embargo, en comparación con la masa de propóleo liberada en la matriz polimérica de CS/EEP (4.93 mg) (tabla 15) se obtiene una menor liberación menor.

Para el ajuste a los modelos matemáticos se obtuvieron los siguientes resultados:

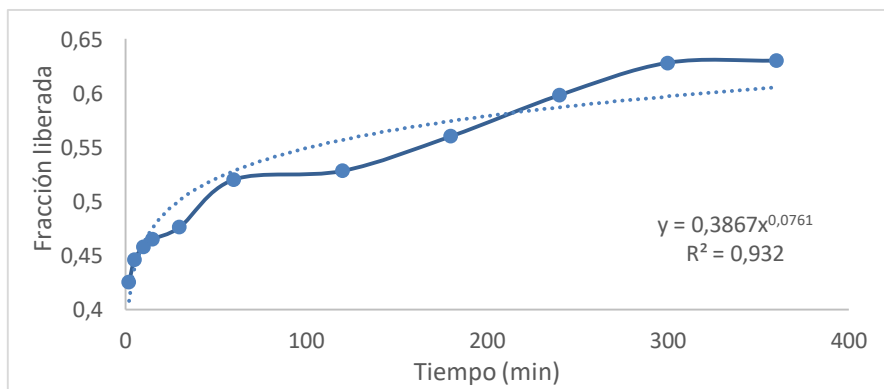


Ilustración 49. Liberación del Propóleo a 30 °C (Korsmeyer-Peppas)

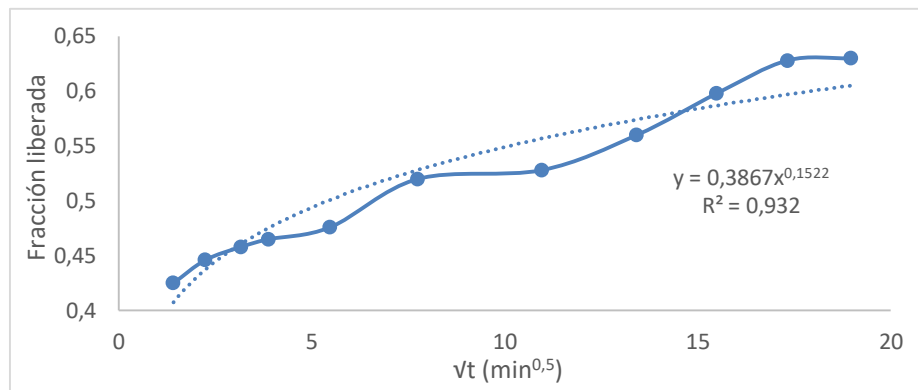


Ilustración 50. Liberación del propóleo a 30°C (Higuchi) para la matriz polimérica CS/EEP/Nps

Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
n	R ²	n	R ²
0,0867	0,8822	0,0434	0,8822

Tabla 19. Parámetros de los modelos matemáticos de Higuchi y Kosmeyer-Peppas para los ensayos de liberación a 30 °C de la matriz polimérica CS/EEP/Nps

De la ilustración 49 y 50 se obtiene que el modelo mejor ajustado es el de Korsmeyer y Peppas, puesto que en este modelo no hay restricciones en el valor de n mientras que el de Higuchi considera que el valor de n tiene que ser cercano a 0.5 (tabla 20). La matriz polimérica va liberando el propóleo a causa del hinchamiento de la membrana y por la difusión entre los poros. (López Gasco, 2011).

Ensayos *in-vitro*

- **Matrices poliméricas**

Para los ensayos *in-vitro* se incubó el hongo en una caja Petri y se tomaron fotos a los 7 y 21 días para observar el crecimiento del mismo. Así mismo por cada ensayo se realiza un control en el cual se encuentra solo el hongo para comparar la inhibición por las matrices poliméricas.

A 7 días de la siembra:

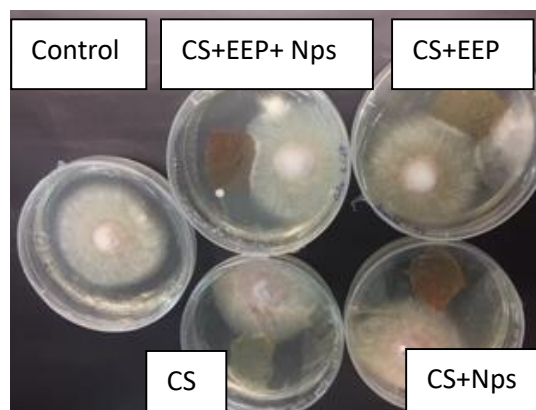


Ilustración 51. Ensayo *in vitro* con matrices poliméricas, a 7 días de la siembra.

A los 21 días:

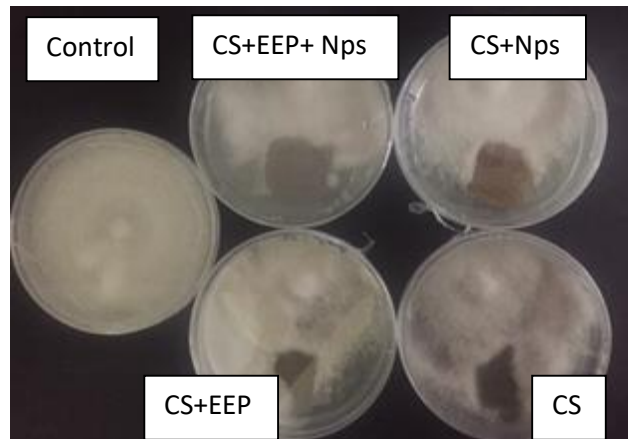


Ilustración 52. Ensayo in vitro con matrices poliméricas, a 21 días de la siembra.

Como se observan en las ilustraciones 51 y 52, el hongo en el control crece de forma más amplia, llegando a ocupar toda la caja Petri. En el caso de las cajas que contienen las matrices poliméricas, el hongo no crece en el espacio ocupado por las matrices poliméricas. Se lo atribuye a que estas generan una barrera, impidiendo el desarrollo del *Fusarium sp*, mostrando así el efecto inhibitorio de la fibra.

- **Soluciones:**

A 6 días de la siembra

Para este ensayo *in-vitro*, se agregaron las diferentes soluciones con las que se sintetizaron las matrices poliméricas en cajas Petri para observar el efecto antifúngico de cada solución. Se midió el crecimiento del hongo en cm para cada caso.

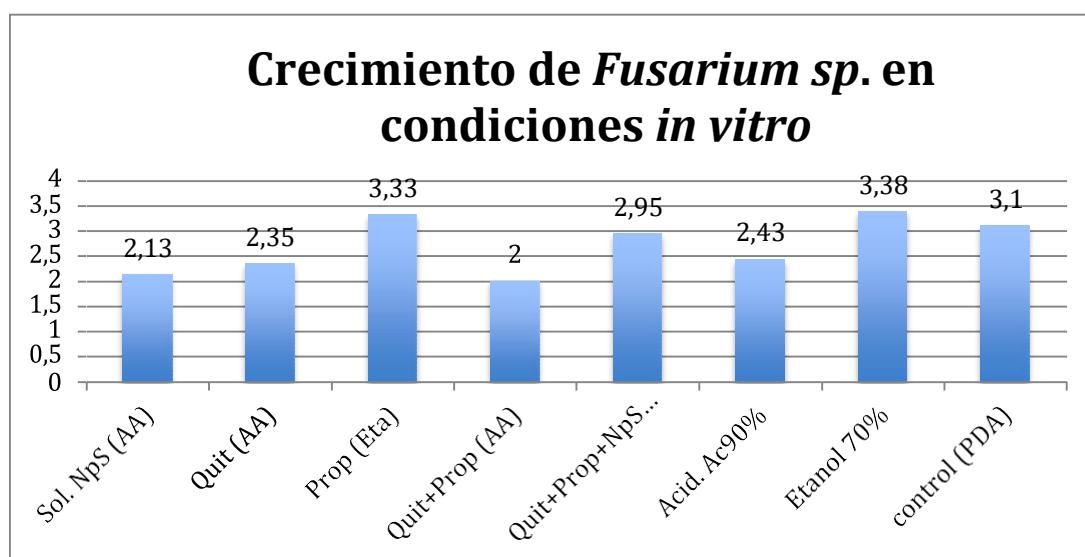


Ilustración 53. Crecimiento de *Fusarium sp.* en cm.



Universidad de Cuenca

En la Ilustración 53, se puede apreciar la inhibición de cada compuesto por separado siendo la solución de propóleo y quitosano en ácido acético la que mejor respuesta tiene ante el hongo *Fusarium sp.* (Manzo Sánchez et al., 2018). Se destaca la sinergia entre 2 compuestos ya que su inhibición cuando se encuentran juntos es mayor a la que exhibieron las soluciones de los mismos por separado.

Aquí el etanol tiene un efecto adverso, donde el hongo en etanol al 70% tiene un mayor crecimiento que el control, además se observa que la solución de ácido acético tiene inhibición por si sola.



CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró sintetizar las Nps de Zn-Fe mediante la técnica solvotermal, se obtuvieron las Nps variando parámetros como temperatura y tiempos de reacción. Las partículas obtenidas en las diferentes síntesis fueron sometidas a un ensayo de sedimentación para observar cual presentaba menor tamaño, siendo JMS3 las que mejores propiedades poseía. Esa síntesis se manejó con las siguientes condiciones: tiempo de reacción de 24 horas, temperatura de 200°C y se utilizó como precursor de zinc el nitrato de zinc.

El propóleo en bruto obtenido de la empresa Dr. Abeja, fue sometido a refinación consiguiendo una cantidad de 3,469 mg la cual se utilizó para todos los demás ensayos.

Se realizó la matriz polimérica de quitosano con Nps y propóleo mediante la técnica de *electrospinning*, utilizando parámetros tales como, flujo de 1 ml/h, distancia de la aguja al colector de 10 cm, número de aguja 8, voltaje de 23 kV y velocidad de rotación del tambor de 500 rpm.

Los ensayos de liberación tuvieron buenos resultados para el propóleo, mientras que para las nanopartículas no hubo liberación, se puede concluir que la matriz polimérica CS/EEP presenta mayor eficiencia de liberación a una temperatura de 40°C en comparación con la de 30°C. Además, la cinética de liberación del propóleo de las matrices poliméricas, se ajustó a los modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas y Higuchi, siendo el modelo de Korsmeyer-Peppas el que mejor se ajustaba con un $R=0,9399$ (CS/EEP a 40°C), $R=0,9846$ (CS/EEP/Nps a 40°C), $R=0,9777$ (CS/EEP a 30°C), $R=0,9881$ (CS/EEP/Nps a 30°C), indicando que en las esferas siguieron un mecanismo de tipo no Fickiano.

En el análisis MET, DRX y SAED se pudo demostrar una cristalinidad de las nanopartículas, con estructura tipo espinela, cumpliendo de esta forma con el objetivo planteado.

Por último, se cumplieron los objetivos planteados de la mejor manera posible, generando resultados favorables los cuales en el futuro podrían ser potencializados mediante nuevas investigaciones tales como ensayos in vitro a mayor profundidad.



RECOMENDACIONES

Realizar la síntesis de solvotermal trabajando con precursores que tengan el mismo contraíón.

Al momento de trabajar con el propóleo, tener la precaución de mantenerlo alejado de la luz debido a su susceptibilidad.

Para el lavado de las Nps se recomienda aumentar el tiempo de centrifugación, para recuperar una mayor cantidad de las mismas.

En el proceso de *electrospinning* se debe tener cuidado con los vapores de ácido acético por lo que se recomienda utilizar equipo de protección. También se tiene que evaluar de mejor manera posible los parámetros a utilizar en el proceso, tales como distancia de la aguja al colector, el voltaje y el flujo.

Cuando se trabaje con las matrices poliméricas utilizar guantes para evitar posibles contaminaciones y daños a la misma.

Electrohilar matices poliméricas variando la composición de propóleo y nanopartículas para observar la influencia de la concentración en las propiedades antifúngicas.

Realizar los ensayos in-vitro con otras cepas de hongos para comparar la efectividad de las matrices poliméricas.

Ensayar con recubrimientos de las matrices poliméricas en frutas para determinar su aplicabilidad.

Producir las matrices poliméricas con otras técnicas de encapsulación.



BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, F. E., Lalia, B. S., & Hashaikeh, R. (2015). A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination*, 356, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.09.033>
- Alvarado López, A. I., & Arcentales, Valdez, M. E. (2019). *Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN-51 caso Ecuador, Zona 6*.
- Aquino, P., Osorio, A. M., Ninán, E., & Torres, F. (2018). Characterization of ZnO nanoparticles synthesized by precipitation method and its evaluation in the incorporation in enamel paints. In *Rev Soc Quím Perú* (Vol. 84, Issue 1).
- Asawahame, C., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., Tragoolpua, Y., Sirithunyalug, B., & Sirithunyalug, J. (2014). Antibacterial Activity and Inhibition of Adherence of *Streptococcus mutans* by Propolis Electrospun Fibers. *AAPS PharmSciTech*, 16(1), 1–2. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0209-5>
- Arockia Jency, D., Sathyavathi, K., Umadevi, M., & Parimaladevi, R. (2020). Enhanced bioactivity of Fe_3O_4 -Au nanocomposites – A comparative antibacterial study. *Materials Letters*, 258, 126795. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126795>
- Benhammada, A., Trache, D., Kesraoui, M., Tarchoun, A. F., Chelouche, S., & Mezroua, A. (2020). Synthesis and characterization of $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles from different precursors and their catalytic effect on the thermal decomposition of nitrocellulose. *Thermochimica Acta*, 686, 178570. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2020.178570>
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 2–21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>
- Bhunja, A., & Saha, S. (2013). Synthesis of Fe_2O_3 Nanoparticles and Study of its Structural, Optical Properties. *Journal of Physical Science*, 17, 191-195.
- Camargo Zambrano, E. R. (2011). *Estudio comparativo de algunas ferritas obtenidas*



por el método citrato. Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá.

Cárdenas Triviño, G., & Cruzat Contreras, C. (2018). Study of Aggregation of Gold Nanoparticles in Chitosan. *Journal of Cluster Science*, 29(6), 3–6.

<https://doi.org/10.1007/s10876-018-1419-x>

Castro Barriga, E. (2014). *Síntesis y caracterización de nanoalambres con composiciones y propiedades microestructurales y magnéticas diseñadas*.

<http://eprints.uanl.mx/id/eprint/4093>

Chawla, S. P., Kanatt, S. R., & Sharma, A. K. (2015). Chitosan. In *Polysaccharides* (pp. 221–225). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_13

Correa Pacheco, Z. N., Bautista Baños, S., Ramos García, M. de L., Martínez González, M. del C., & Hernández Romano, J. (2019). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticle films. *Progress in Organic Coatings*, 137, 7–8. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105326>

Cortés Barrena, J. (2018). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxidos de hierro*. https://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/30639/Cortes_Barrena_Javier_TFG_106710.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Cortés Higareda, M., Ramos García, M., Correa Pacheco, Z., Del Río García, J., & Bautista Baños, S. (2019). Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. *Heliyon*, 5(5), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01776>

Da Silva, C., Prasniewski, A., Calegari, M. A., de Lima, V. A., & Oldoni, T. L. C. (2018). Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Propolis Using ATR–FT-IR Spectroscopy and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 11(7), 5–6. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1161-x>

Da Silva, T. G., Azevedo Fonseca, P., Farias, L. da R., Guerra, L., Celerino, I. C., & Grillo Aparecido Meireles, L. (2016). Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 5–9. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1161-x>



- Daraio, M. Y., Melaj, M. A., & Daraio, M. E. (2012). Matrices poliméricas sólidas basadas en quitosano y xantano para liberación controlada de fertilizantes. *ACI*, 3(1), 1–9. www.senasa.gov.ar
- Darder, M., Aranda, P., & Ruiz-Hitzky, E. (2007). Bionanocomposites: A New Concept of Ecological, Bioinspired, and Functional Hybrid Materials. *Advanced Materials*, 19(10), 15–18. <https://doi.org/10.1002/adma.200602328>
- Davarpanah, A. M., Rahdar, A., Dastnae, M. A., Zeybek, O., & Beyzaei, H. (2019). (1-x)BaFe₁₂O₁₉/ xCoFe₂O₄hard/soft magnetic nanocomposites: Synthesis, physical characterization, and antibacterial activities study. *Journal of Molecular Structure*, 1175, 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.07.092>
- Delgado, M. L., Rodríguez, A. C., & Ochoa, P. P. (2014). Estudios espectroscópicos (UV-VIS, fluorescencia y FTIR) de propóleo colectado en el municipio de Zapopan, Jalisco. *Revista Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*, 2(1). https://www.researchgate.net/publication/308632447_Estudios_espectroscopicos_UVVIS_fluorescencia_y_FTIR_de_propoleo_colectado_en_el_municipio_de_Zapopan_Jalisco
- Dionisio, R., Cortés Rodríguez, R., & Hernández, C. (2013). *Antifungal activity of propolis obtained at three Cuban provinces against fungal contaminants in plant tissue culture*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41629561001>
- Downs, R. T. (2018). *American Mineralogist Crystal Structure Database*. <http://rruff.geo.arizona.edu/AMS/amcsd.php>
- Espinosa Avila, E. A. (2015). *Desarrollo y caracterización de un recubrimiento para carne de bovino a base de quitosano y propóleos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas*. <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/811>
- Expósito Harris, R. (2010). *Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=93549>
- Fang, Z., Zhang, L., Qi, H., Yue, H., Zhang, T., Zhao, X., Chen, G., Wei, Y., Wang, C., & Zhang, D. (2018). Nanosheet assembled hollow ZnFe₂O₄ microsphere as anode



- for lithium-ion batteries. *Journal of Alloys and Compounds*, 762, 481–483.
<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.05.259>
- FAO. (2009). *La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050*.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf
- Fernández Aragón, J., Santos González, R., Guerra Valdés, B., & Oliver, L. (2009). Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃. In *Rev. Iberoamer. Polím* (Vol. 10, Issue 6).
- Franca, J. R., De Luca, M. P., Ribeiro, T. G., Castilho, R. O., Moreira, A. N., Santos, V. R., & Faraco, A. A. G. (2014). Propolis - based chitosan varnish: Drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 4–7.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-478>
- Gao, G., Huang, P., Zhang, Y., Wang, K., Qin, W., & Cui, D. (2011). Gram scale synthesis of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and fluid via a facile solvothermal route. *CrystEngComm*, 13(6), 1782–1784.
<https://doi.org/10.1039/c0ce00584c>
- García-Gutiérrez, C., & Rodríguez-Mesa, G. D. (2012). Determinantes ambientales que afectan el perfil de salud de población del Meta 2012-2014. *Ra Ximhai*, 8(3), 41–49.
- García, N. (2013). Electrospinning: una Técnica Fascinante para la Obtención de Matrices poliméricas Poliméricas. *Revista de Plásticos Modernos: Ciencia y Tecnología de Polímeros*, 677, 166–173.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4234241>
- Ghorbani, H. R., Mehr, F. P., Pazoki, H., & Rahmani, B. M. (2015). Synthesis of ZnO Nanoparticles by Precipitation Method. *Oriental Journal of Chemistry*, 31(2), 1219-1221.
- Ghosh, A., & Ali, M. A. (2012). Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids. *Journal of Materials Science*, 47(3), 4–7.
<https://doi.org/10.1007/s10853-011-5885-x>



- González, M. C., Creus Hernandez, A., & Orive González, A. (2012). *Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda metallic nanoparticles and surface plasmons: a deep relationship*.
https://www.researchgate.net/publication/280933878_NANOPARTICULAS_METALICAS_Y_PLASMONES_DE_SUPERFICIE_UNA_RELACION_PROFUNDA_METALLIC_NANOPARTICLES_AND_SURFACE_PLASMONS_A_DEEP_RELATIONSHIP
- Gregoris, E., & Stevanato, R. (2010). Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.018>
- Güler, S. H., Güler, Ö., Evin, E., & Islak, S. (2016). Electrical and optical properties of ZnO-milled Fe₂O₃ nanocomposites produced by powder metallurgy route. *Optik*, 127(6), 3187-3191. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.12.103>
- Gutiérrez Wing, C. E. (2006). *Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tienen?*
<http://inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/39%20NANOPARTICULAS.pdf>
- Hamann, J. E., Pérez, G., Barrero, C. A., Morales, A. L., & Costa, G. M. (2004). Caracterización de hematitas dopadas con zn obtenidas a partir de oxinatos de Fe-Zn tratados térmicamente. *Revista Colombiana de Física*, 32(June 2015), 3–6.
- Honarkar, H., & Barikani, M. (2009). Applications of biopolymers I: Chitosan. *Monatshefte Fur Chemie*, 140(12), 1404–1416. <https://doi.org/10.1007/s00706-009-0197-4>
- Huang, Y., Tang, Y., Xu, S., Feng, M., Yu, Y., Yang, W., & Li, H. (2020). A highly sensitive sensor based on ordered mesoporous ZnFe₂O₄ for electrochemical detection of dopamine. *Analytica Chimica Acta*, 1096, 2–6.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.048>
- Jadhav, D. L., Karthick, N. K., Kannan, P. P., Shanmugam, R., Elangovan, A., & Arivazhagan, G. (2017). Molecular interaction forces in acetone + ethanol binary liquid solutions: FTIR and theoretical studies. *Journal of Molecular Structure*, 1130, 3–6. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.10.055>
- Jaramillo Nieves, J. (2012). *Síntesis y caracterización de pigmentos cerámicos tipo*



espinela $Zn_{1-x}Fe_xCr_2O_4$ por los métodos de molienda de alta energía y coprecipitación asistida por ultrasonido.

<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11142>

Jayakumar, O. D., Salunke, H. G., Kadam, R. M., Mohapatra, M., Yaswant, G., & Kulshreshtha, S. K. (2006). Magnetism in Mn-doped ZnO nanoparticles prepared by a co-precipitation method. *Nanotechnology*, 17(5), 1278–1280.
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/5/020>

Joya, M. R., Barón-Jaimez, J., & Barba-Ortega, J. (2013). Preparation and characterization of Fe_2O_3 nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 466, 012004. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/466/1/012004>

Kaur, P., Thakur, R., Duhan, J. S., & Chaudhury, A. (2018). Management of wilt disease of chickpea in vivo by silver nanoparticles biosynthesized by rhizospheric microflora of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(11), 3–30. <https://doi.org/10.1002/jctb.5680>

Khadri, H., Alzohairy, M. A., Avilala, J., Kumar, P., Alzohairy, M., Janardhan, A., Praveen Kumar, A., & Narasimha, G. (2013). *Green Synthesis of Silver Nanoparticles with High Fungicidal Activity from Olive Seed Extract Development of Beneficial and Effective Microorganisms for Improvement of Soil Quality and Sustainable Agriculture*. <https://doi.org/10.4236/anp.2013.23034>

León, D. A. (2017). *Estudio DFT de las propiedades estructurales y electrónicas de las espinelas Mg_2TiO_4 y Zn_2TiO_4* . Universidad Nacional de Colombia.

Lira, S., M Hernández, S., & Hernández, C. (2006). Actividad de extractos de *larrea tridentata* (d.c.) coville (l.) y quitosán contra hongos que afectan cultivos hortícolas. In *Revista Chapingo Serie Horticultura* (Vol. 12, Issue 2).
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912212>

Liu, K., Qin, Y., Muhammad, Y., Zhu, Y., Tang, R., Chen, N., Shi, H., Zhang, H., Tong, Z., & Yu, B. (2019). Effect of Fe_3O_4 content and microwave reaction time on the properties of Fe_3O_4/ZnO magnetic nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 781, 790-799. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.12.085>

Li, X., Jin, B., Huang, J., Zhang, Q., Peng, R., & Chu, S. (2018). $Fe_2O_3/ZnO/ZnFe_2O_4$



composites for the efficient photocatalytic degradation of organic dyes under visible light. *Solid State Sciences*, 80, 6-14.

<https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2018.03.016>

Liu, X., Liu, J., Zhang, S., Nan, Z., & Shi, Q. (2016). Structural, Magnetic, and Thermodynamic Evolutions of Zn-Doped Fe₃O₄ Nanoparticles Synthesized Using a One-Step Solvothermal Method. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(2), 3–15. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b10618>

López Gasco, P. (2011). *Preparación, caracterización y evaluación biológica de nanopartículas poliméricas para la liberación controlada del paclitaxel*. Universidad Complutense de Madrid.

Maftoonazad, N., & Ramaswamy, H. (2018). Novel techniques in food processing: bionanocomposites. *Current Opinion in Food Science*, 23, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.010>

Manzo Sánchez, G., Pérez Ocón, R., Chan Cupul, W., Silva Jiménez, E., Sánchez Rangel, J., Ayala Zermeño, M., & Galindo Velasco, E. (2018). Antifungal activity of ethanolic extracts of propolis against *Mycosphaerella fijiensis*: an in vitro study. *Scientia Fungorum*, 47, 14–21.

Martínez Flórez, S., González Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., & Jesús Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271–278.

Martins, P. R. (2013). *Introducción a la nanotecnología*. Reverté

Matei, P. M., Martín Ramos, P., Sánchez Báscones, M., Hernández Navarro, S., Correa Guimaraes, A., Navas Gracia, L. M., Rufino, C. A., Ramos Sánchez, M. C., & Martín Gil, J. (2015). Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*. *International Journal of Polymer Science*, 2–8. <https://doi.org/10.1155/2015/864729>

Mei, X. D., Liang, Y. H., Zhang, T., Ning, J., & Wang, Z. Y. (2014). An amphiphilic chitosan-poly lactide graft copolymer and its nanoparticles as fungicide carriers. *Advanced Materials Research*, 1051, 21–28.



<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1051.21>

- Meng, X., Luo, N., Cao, S., Zhang, S., Yang, M., & Hu, X. (2009). In-situ growth of titania nanoparticles in electrospun polymer nanofibers at low temperature. *Materials Letters*, 63(16), 1401–1403. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.03.023>
- Mezzenga, R., & Ruokolainen, J. (2009). Nanocomposites: Nanoparticles in the right place. *Nature Materials*, 8(12), 926–928. <https://doi.org/10.1038/nmat2576>
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2007). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 567–569. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634>
- Montoya Carvajal, J. F., Chavarriaga Miranda, E. A., Villada Gil, S., & MuñozGarcía, Andrés Mauricio Óscar Restrepo Baena, J. (2015). Síntesis y caracterización de la Espinela FeCr2O4. *Producción Más Limpia*, 10(1), 64–72.
- Morán Lopez, J. L., & Rodríguez López, J. L. (2013). *Los materiales nanoestructurados sus propiedades y aplicaciones en la revolución científica y tecnológica del siglo XXI* (C. E-libro (ed.); E-libro, C). Fondo de Cultura Económica.
- Muñoz, B., Pérez, V., Polanco, Á. G., & Isabel, P. (2007). El monitoreo y manejo de la resistencia a los fungicidas en Cuba. *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal*, 11, 4–6. <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/230>
- Muñoz Sandoval, C. J. (2017). *Degradación foto catalítica de timerosal mediante nanopartículas de ferrita de zinc activadas con radiación solar*. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/2673>
- Pardini, F. M. (2010). *Síntesis y caracterización de una matriz polimérica para la liberación controlada de principios activos*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/75762>
- Paula, V. B., Estevinho, L. M., & Dias, L. G. (2017). Quantification of three phenolic classes and total phenolic content of propolis extracts using a single UV-vis spectrum. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 569-580. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1370904>
- Peng, L., Yang, S., Cheng, Y. J., Chen, F., Pan, S., & Fan, G. (2012). Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium*



- italicum. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1533–1539.
<https://doi.org/10.1007/s10068-012-0204-0>
- Pérez, M. A., Navarro, H., & Miranda, E. (2013). Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 3–19.
- Persano, L., Camposeo, A., Tekmen, C., & Pisignano, D. (2013). Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering*, 298(5), 504–520.
<https://doi.org/10.1002/mame.201200290>
- Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos, A. G. (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. In *Tissue Engineering* (Vol. 12, Issue 5, pp. 1198–1201). <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1197>
- Philibert, T., Lee, B. H., & Fabien, N. (2017). Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(4), 1314–1337. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2286-2>
- Poole, C. P., & Owens, F. J. (2003). *Introducción a la Nanotecnología* (Edición en). [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=xmWImflMcAAC&oi=fnd&pg=PA1&dq=introducción+a+la+nanotecnología&ots=TSOsiJtAuR&sig=CvBEfaICPitaYUbAUDmUMnFCIPg&redir_esc=y#v=onepage&q=introducción a la nanotecnología&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=xmWImflMcAAC&oi=fnd&pg=PA1&dq=introducción+a+la+nanotecnología&ots=TSOsiJtAuR&sig=CvBEfaICPitaYUbAUDmUMnFCIPg&redir_esc=y#v=onepage&q=introducción+a+la+nanotecnología&f=false)
- Rajamathi, M., & Seshadri, R. (2002). Oxide and chalcogenide nanoparticles from hydrothermal/solvothermal reactions. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 337–345. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00029-3](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00029-3)
- Raquel, V. G., & Lucila, M. P. (2015). Using silver nanoparticles for control pathogenic microorganisms in foods. *Limentech ciencia y tecnología alimentaria*, 13, 54–59.
- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., & Mohanty, A. K. (2013). Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. In *Progress in Polymer Science* (Vol. 38, Issues 10–11, pp. 1653–1689). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006>
- Regnier, T., du Plooy, W., & Combrinck, S. (2009). Essential oil amended coatings as



- alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. *Postharvest Biology and Technology*, 53(3), 117–122.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.04.005>
- Reinaldo, P., & Tamay, C. (2019). *Obtención de microfibras de quitosano funcionalizadas con nanopartículas de Fe₃O₄ para su aplicación como adsorbente en la remoción de cromo (VI) en soluciones acuosas*.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rivero García, M. (2018). *Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas de ferrita de zinc para tratamientos combinados en biomedicina*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Rodriguez Martinez, C., Joshi, P., Vera, J., & Ramirez, J. (2011). *Cytotoxic studies of PEG functionalized ZnO nanoparticles on MCF-7 cancer cells*. 2–4.
https://www.researchgate.net/publication/289030300_Cytotoxic_studies_of_PEG_functionalized_ZnO_nanoparticles_on_MCF-7_cancer_cells
- Sanchez, F., & Sobolev, K. (2010). Nanotechnology in concrete - A review. *Construction and Building Materials*, 24(11), 206–2068.
<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014>
- Sharma, P., Sharma, A., Sharma, M., Bhalla, N., Estrela, P., Jain, A., Thakur, P., & Thakur, A. (2017). Fungicides: Nanomaterial Fungicides: In Vitro and In Vivo Antimycotic Activity of Cobalt and Nickel Nanoferrites on Phytopathogenic Fungi (Global Challenges 9/2017). *Global Challenges*, 1(9), 7–11.
<https://doi.org/10.1002/gch2.201770071>
- Silva, B. B., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ikegaki, M., Souza, V. C., Esteves, A., & Alencar, S. M. (2008). Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3), 313–316. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem059>
- Silva Castro, I., Martín García, J., Diez, J. J., Flores Pacheco, J. A., Martín Gil, J., & Martín Ramos, P. (2018). Potential control of forest diseases by solutions of chitosan oligomers, propolis and nanosilver. *European Journal of Plant Pathology*,



- 150(2), 401–411. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1288-4>
- Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>
- Stangaciu, S. (1998). Composición Y Propiedades Del Propóleo. *Apiacta*, XXXIII, 71–77. <http://bee-winner.com/Dr.pdf>
- Stankic, S., Suman, S., Haque, F., & Vidic, J. (2016). Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 2–8. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0225-6>
- Sun, F., Bao, B., Ma, L., Chen, A., & Duan, X. (2012). Mould-resistance of bamboo treated with the compound of chitosan-copper complex and organic fungicides. *Journal of Wood Science*, 58(1), 51–56. <https://doi.org/10.1007/s10086-011-1223-9>
- Surendra, B. S., Nagaswarupa, H. P., Hemashree, M. U., & Khanum, J. (2020). Jatropha extract mediated synthesis of ZnFe_2O_4 nanopowder: Excellent performance as an electrochemical sensor, UV photocatalyst and an antibacterial activity. *Chemical Physics Letters*, 739, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136980>
- Suriyatem, R., Auras, R. A., Rachtanapun, C., & Rachtanapun, P. (2018). Biodegradable rice starch/carboxymethyl chitosan films with added propolis extract for potential use as active food packaging. *Polymers*, 10(9), 2–11. <https://doi.org/10.3390/polym10090954>
- Vargas Hernández, C., Bernal, C., Jurado, J. F., & Monter, A. (2009). Sinterización y propiedades estructurales de espinelas del tipo ZnCr_2O_4 . 1(2), 533–536.
- Vázquez, J. C. (2010). *Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola I - Cuenca del Salado, Pcia. de Buenos Aires*. 230.
- Vikesland, P. J., Rebodos, R. L., Bottero, J. Y., Rose, J., & Masion, A. (2016). Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters. *The Royal Society of Chemistry*, 3(3), 567–577. <https://doi.org/10.1039/c5en00155b>
- Viñanzaca, J. E. (2019). *Síntesis solvotermal de nanopartículas de cobre, su*



- encapsulación en la matriz quitosano/capsaicina y estudio de liberación* (Issue 9) [Universidad de Cuenca]. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vinosha, P. A., Mely, L. A., Jeronsia, J. E., Krishnan, S., & Das, S. J. (2017). Synthesis and properties of spinel ZnFe₂O₄ nanoparticles by facile co-precipitation route. *Optik*, 134, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2017.01.018>
- Virga, M. C. D. (2018). Propolis: a therapeutic alternative for oral cavity. *Journal of Dental Science, Oral and Maxillofacial Research*, 1(2), 67–70. <https://doi.org/10.30881/jdsomr.00014>
- Wu, C., Xu, Y., Xu, S., Tu, J., Tian, C., & Lin, Z. (2019). Enhanced adsorption of arsenate by spinel zinc ferrite nano particles: Effect of zinc content and site occupation. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 79, 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.09.010>
- Wu, K., Jia, Z., Zhou, L., Yuan, S., & Cui, J. (2020). Study on the effect of methanol on the morphology and optical properties of ZnO. *Optik*, 205, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2020.164250>
- Xing, K., Zhu, X., Peng, X., & Qin, S. (2015). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 569–588. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3>
- Xu, L., Wang, X., Xian, F., & Su, J. (2020). Doping-induced transition from polycrystals to single crystals in ZnO thin films. *Materials Research Bulletin*, 123, 2–32. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2019.110724>
- Yang, Y., Matsubara, S., Xiong, L., Hayakawa, T., & Nogami, M. (2007). Solvothermal Synthesis of Multiple Shapes of Silver Nanoparticles and Their SERS Properties. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(26), 9095–9104. <https://doi.org/10.1021/jp068859b>
- Yu, X., Shan, Y., & Chen, K. (2018). Fabrication and characterization of morphology-tuned single-crystal monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals. *Applied Surface Science*, 439, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.12.229>
- Zhang, H. J., Meng, F. N., Liu, L. Z., Chen, Y. J., & Wang, P. J. (2018). Highly sensitive H₂S sensor based on solvothermally prepared spinel ZnFe₂O₄



Universidad de Cuenca

nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 764, 147–154.

<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.06.052>



Ilustración 54. Etanol, quitosano y ácido acético utilizado en el trabajo de titulación



Ilustración 55 Medición de la masa de los reactivos utilizados



Ilustración 56 Lavado de nanopartículas



Ilustración 57 Secado y almacenamiento de nanopartículas



Ilustración 58 Maceración del propóleo en etanol



Ilustración 59 Precipitación de las ceras del propóleo



Ilustración 60 Preparación de las soluciones poliméricas



Ilustración 61 Electrohilado de las fibras



Ilustración 62 Ensayos de liberación



Ilustración 63 Almacenamiento de la fibra en una funda ziploc

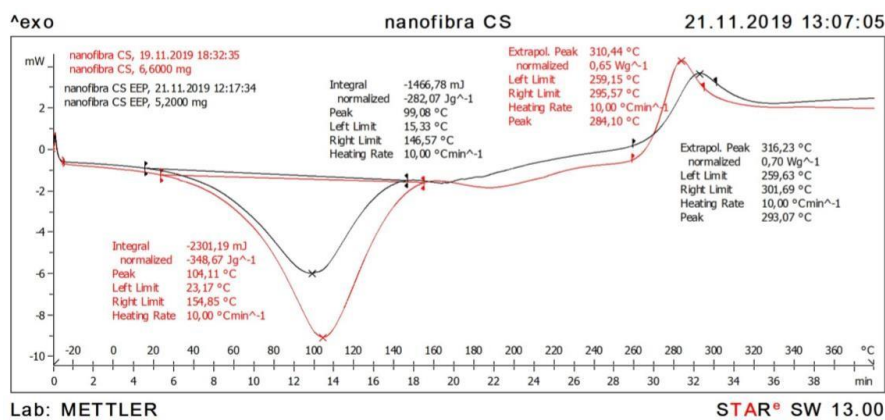


Ilustración 64. DSC para las matrices poliméricas CS (rojo) y CS/EEP (negro)

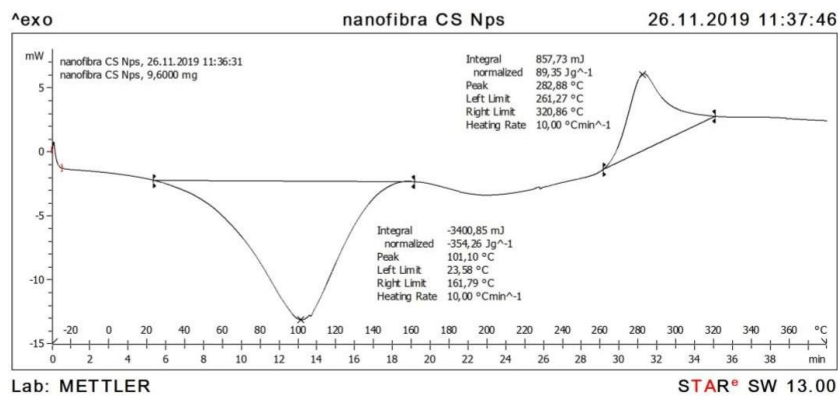


Ilustración 65. DSC de la matriz polimérica CS/Nps

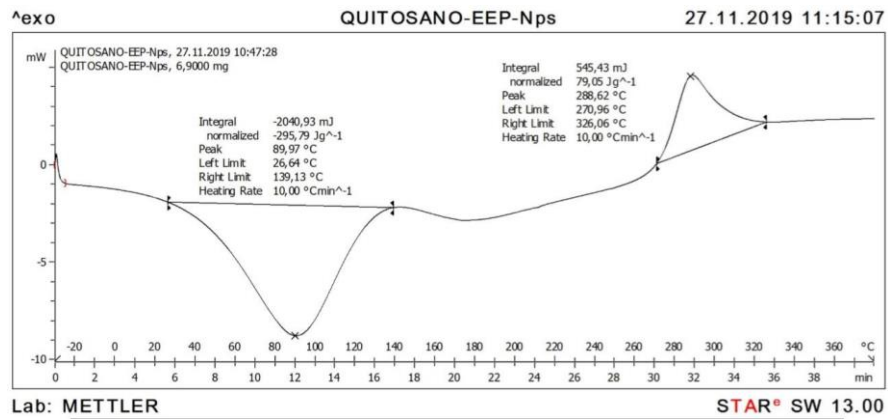


Ilustración 66. DSC de la matriz polimérica CS/EEP/Nps



Ilustración 67 Ensayo de estabilidad de las fibras elaboradas



Ilustración 68 Ensayo de sedimentación de las nanopartículas

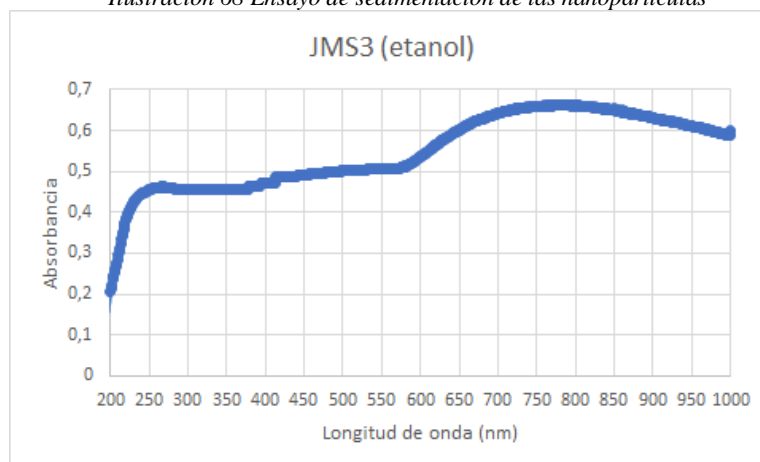


Ilustración 69. Barrido espectral de la muestra JMS3 en etanol

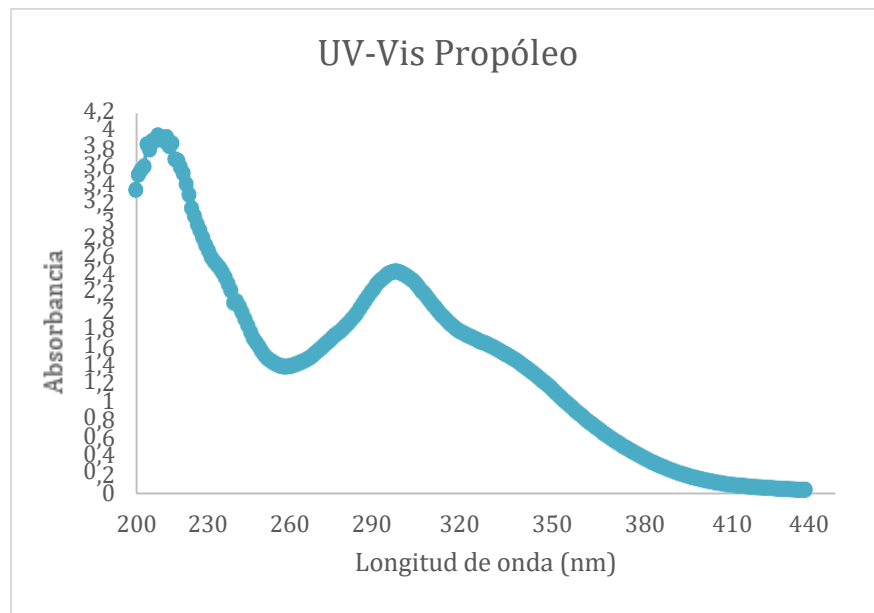


Ilustración 70 Espectro UV-Vis del propóleo

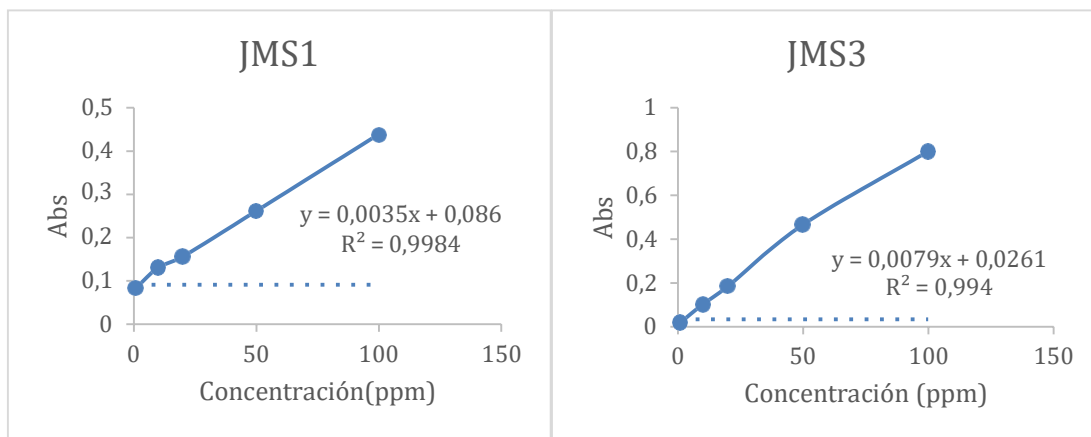


Ilustración 71 Curvas de calibración de muestras de nanopartículas JMS1 y JMS3

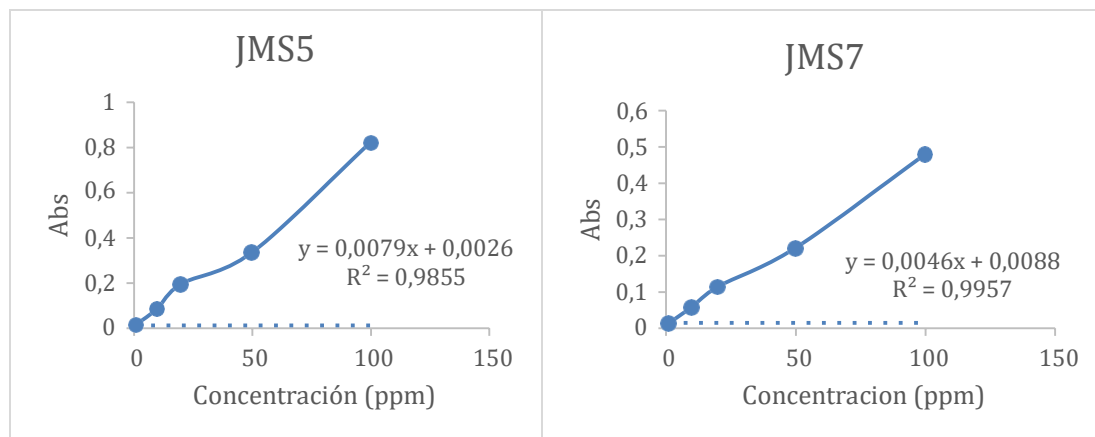


Ilustración 72 Curvas de calibración de las muestras de nanopartículas JMS5 y JMS7

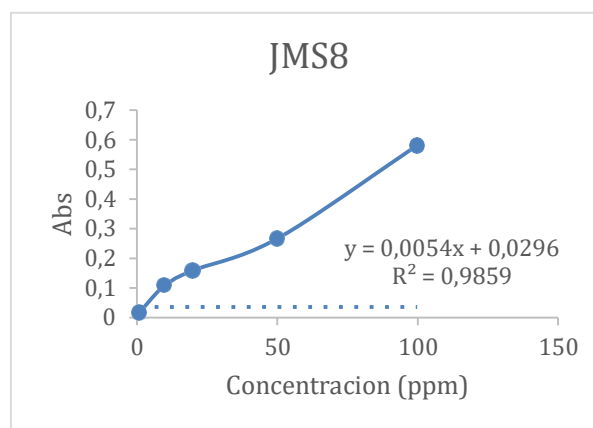


Ilustración 73 Curva de calibración de la muestra de nanopartículas JMS8

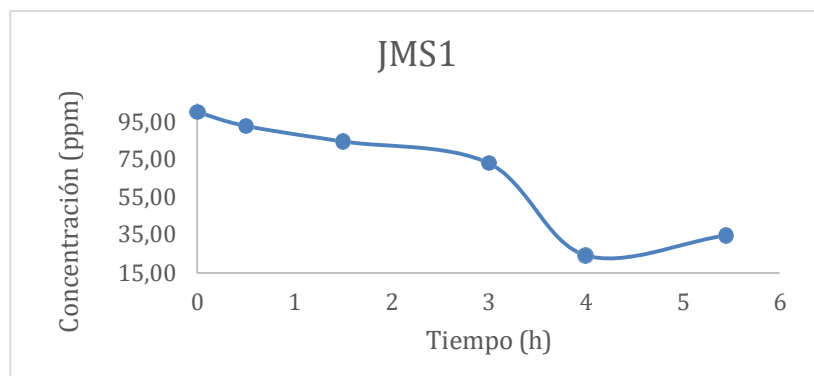


Ilustración 74 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS1

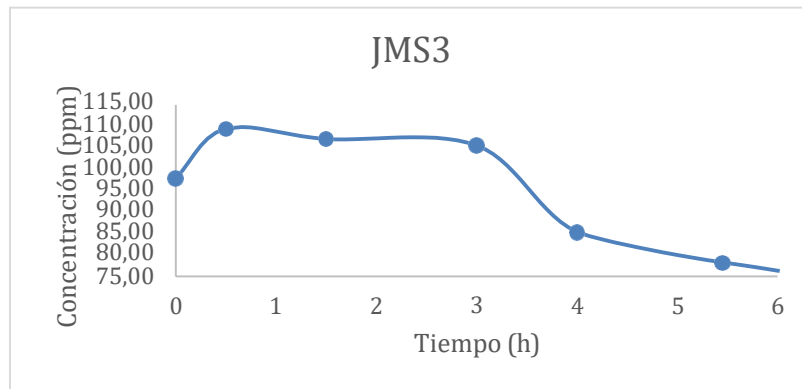


Ilustración 75 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS3

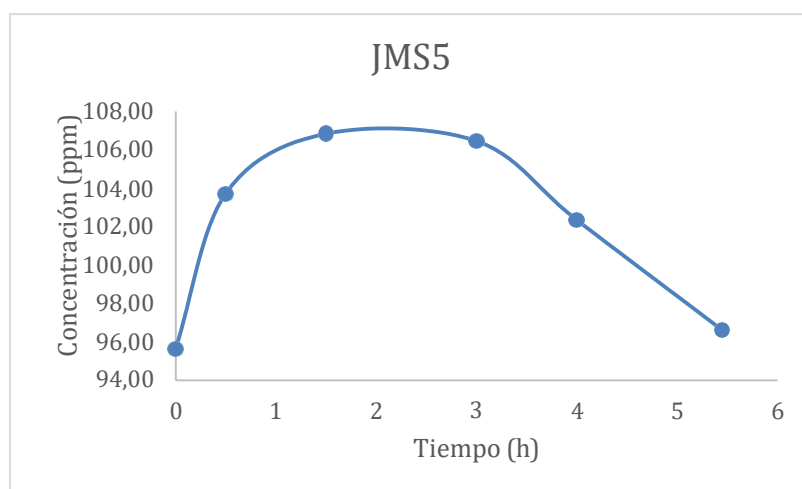


Ilustración 76 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS5

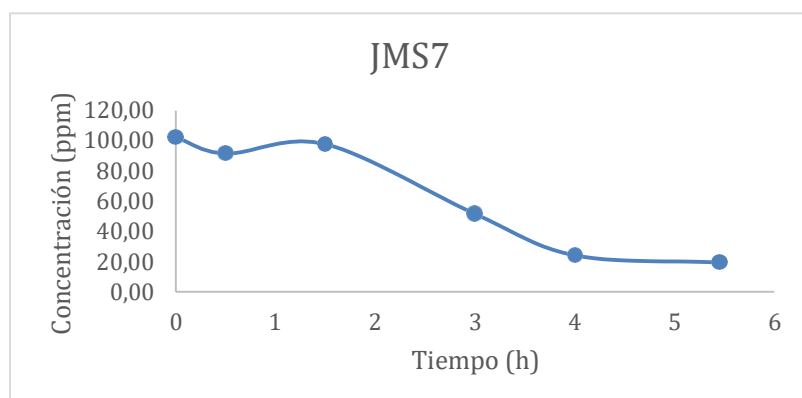


Ilustración 77 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS7

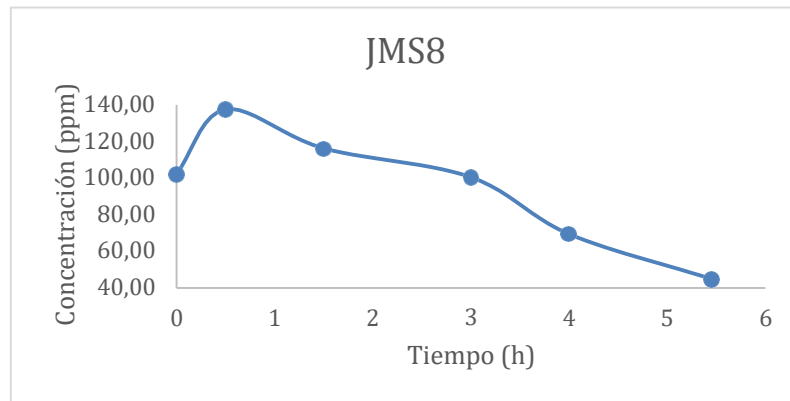


Ilustración 78 Curva, Concentración vs tiempo, ensayo de sedimentación JMS8

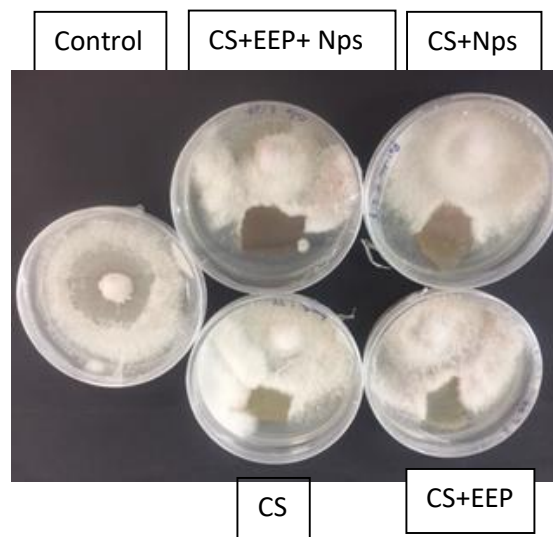


Ilustración 79 Ensayo in vitro con fibras, a 14 días de la siembra



Ilustración 80 Ensayos in vitro en naranjas